

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
Departamento de Química Orgánica I



AVANCES EN RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR
ULTRARRÁPIDA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Encarnación Fernández Valle

Bajo la dirección del doctor

Antonio Herrera Fernández

Madrid, 2013



**Departamento de Química Orgánica I
Facultad de Ciencias Químicas
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

Avances en Resonancia Magnética Nuclear Ultrarrápida

TESIS DOCTORAL

Encarnación Fernández Valle

Madrid, 2013

A mis chicos

“Eppur si muove”
Galileo Galilei



D. ANTONIO HERRERA FERNÁNDEZ, Catedrático de Química Orgánica y Director del CAI de R.M.N. y R.S.E. de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA: Que el trabajo realizado en la presente memoria titulada "*Avances en Resonancia Magnética Nuclear ultrarrápida*" ha sido realizado en el Departamento de Química Orgánica I y en el CAI de RMN y RSE de la Universidad Complutense de Madrid, por D^a. Encarnación Fernández Valle y autoriza su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Madrid, 14 de junio de 2013

Fdo: Antonio Herrera Fernández



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas y en el CAI de R.M.N. y R.S.E. de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Profesor Antonio Herrera Fernández, dentro del marco de los proyectos CTQ2007-61973 y CTQ2010-14936.



Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis se recogen en las siguientes publicaciones:

– **Real-Time Monitoring of Organic Reactions with Two-Dimensional Ultrafast TOCSY NMR Spectroscopy**

Antonio Herrera, Encarnación Fernández-Valle, Roberto Martínez-Álvarez, Dolores Molero, Zulay D. Pardo, Elena Sáez, Maayan Gal

Angew. Chem. Int. Ed. **2009**, 48, 6274–6277

– **2D Ultrafast HMBC: A Valuable Tool for Monitoring Organic Reactions.**

Antonio Herrera, Encarnación Fernández-Valle, Eva M. Gutiérrez, Roberto Martínez-Álvarez, Dolores Molero, Zulay D. Pardo, Elena Sáez

Org. Lett. **2010**, 12 (1), 144-147

Agradecimientos

En primer lugar tengo que agradecer el apoyo de Antonio Herrera, mi director de tesis y el “gran jefe” de la resonancia de la UCM. Su dedicación, su esfuerzo y su apoyo han sido claves para la realización de esta Tesis Doctoral, sin él ni siquiera me hubiese planteado empezar y menos llegar hasta aquí. Tengo que agradecerle su infinita paciencia y lo bien que ha sabido sobrellevar mis momentos de mal humor.

Lola, ¿cuántas horas sentadas juntas en las consolas de los imanes, peleándonos con los experimento, buscando las señales que se habían ido “ultrarrápidamente” no sabemos dónde? Muchas gracias por todo el trabajo que hemos compartido juntas y, sobre todo, muchas gracias por haberme escuchado cuando las cosas no iban tan bien, no sólo en el laboratorio. Sin tu ayuda no hubiese podido hacer ni la mitad de este trabajo.

Evidentemente no puedo olvidar a Palmira, con la que llevo ¡20 años! trabajando y que fue pionera en el desarrollo de las “ventanas” para el procesamiento de los espectros “ultrarrápidos”. Ni a Zulay, con la que hablo de pulsos chirp, offsets y gradientes hasta cuando hablamos de otras cosas y con la que he compartido “el frío” de la sala de resonancia. Por supuesto, tampoco a David, por todas las imágenes que ha adquirido y segmentado por mí, sobre todo en estos últimos meses. Ni a Elena, muchas gracias por tu ayuda con las señales “aromáticas”, “alifáticas” y “olefínicas” y por la “estilosa” y “estilística” revisión de la memoria. A Roberto Martínez, por sus discusiones científicas y enológicas. Y como no, a Ángel, gracias por estar siempre ahí.

Tengo que agradecer a Lucio Frydman, a Maayan, a Mor y a Boaz, por haberme abierto las puertas de su laboratorio en Rehovot y por haberme enseñado todas las bases de la técnica.

Muchas gracias también a todos los compañeros del Departamento de Química Orgánica I de la UCM, por haber dejado que Lola rebuscase en sus laboratorios a la búsqueda de la muestra perfecta para los experimentos.

Y sobre todo, muchas muchas gracias a mis chicos, Pedro, Ángel y Pablo, que han aguantado horas y horas de trabajo en el laboratorio y en casa, de mal humor y llanto. Gracias por compartir conmigo todas mis alegrías y mis tristezas y por encima de todo por estar siempre a mi lado.

Índice

ÍNDICE

Abreviaturas empleadas	i
Nota sobre puntuación	iii
Nota sobre las referencias bibliográficas	iii
Abstract	v
I. Introducción	1
II. Antecedentes	5
II.1 Características de la RMN clásica.	7
II.2 Secuencias rápidas de RMN	10
II.2.1 Técnicas rápidas de pulsos.....	12
II.2.2 Técnicas de muestreo rápido	17
II.3 Secuencias de RMN ultrarrápidas (UF-NMR)	19
II.3.1. Principios.....	21
II.3.2. Características generales.	23
II.3.3. Aspectos experimentales	38
II.3.4. Aplicaciones en sistemas químicos y biofísicos	45
II.3.5. Ventajas e inconvenientes.....	51
III. Objetivos	53
IV. Metodología	57
Capítulo 1: Realización del experimento de RMN ultrarrápido: pasos necesarios	59
1.1. Programa de pulsos	61
1.2. Herramientas informáticas.....	63
1.3. Adquisición del experimento de RMN ultrarrápido.....	71
1.4. El experimento básico de RMN ultrarrápido	74
1.5. Estrategias metodológicas	76
Capítulo 2: Secuencias para la monitorización del acoplamiento escalar	81
2.1. Monitorización del acoplamiento escalar homonuclear	83
2.1.1. Codificación modulada en amplitud	
2.1.1.1. UF-TOCSY	83
2.1.1.2. UF-COSY.....	85
2.1.2. Codificación de tiempo constante	87
2.1.2.1. UF-TOCSY	87
2.1.2.2. UF-COSY.....	88
2.2. Monitorización del acoplamiento escalar heteronuclear	90
2.2.1. Acoplamiento ^1H , ^{13}C	90
2.2.1.1. UF-HSQC	91

2.2.1.2.	UF-HBMC	92
2.2.2.	Acoplamiento ^1H , ^{15}N	93
2.2.3.	Acoplamiento ^1H , ^{31}P	94
2.3.	Estudio de sistemas dinámicos	96
2.3.1.	Seguimiento homonuclear mediante UF-TOCSY	96
2.3.2.	Seguimiento heteronuclear mediante UF-HMBC	100
2.3.3.	Monitorización combinada mediante UF-TOCSY/HMBC	103
Capítulo 3: Monitorización del acoplamiento dipolar		107
3.1.	Secuencia UF-NOESY	110
3.2.	Modificaciones a la secuencia UF-NOESY	111
3.3.	Secuencia UF- <i>Exo</i> -NOESY	113
Capítulo 4: Nuevas estrategias de procesado de los espectros de RMN ultrarrápida		119
4.1.	Nuevos programas de tratamiento de datos	121
4.2.	Nuevas herramientas para la monitorización de sistemas dinámicos	128
V.	Conclusiones	131
VI	Parte experimental	137
VI.1.	Aspectos generales	139
VI.2.	Espectro básico de UF-NMR	141
VI.3.	Secuencias escalares homonucleares	143
VI.3.1.	Codificación modulada en amplitud	143
VI.3.2.	Codificación de tiempo constante	145
VI.4.	Secuencias escalares heteronucleares	146
VI.4.1.	Experimentos ^1H , ^{13}C	146
VI.4.2.	Experimentos ^1H , ^{15}N	147
VI.4.3.	Experimentos ^1H , ^{31}P	148
VI.5.	Secuencias dinámicas de monitorización	148
VI.5.1.	Experimento UF-TOCSY dinámico	149
VI.5.2.	Experimento UF-HMBC dinámico	149
VI.5.3.	Experimento UF-TOCSY/HMBC dinámico	150
VI.6.	Secuencias dipolares homonucleares	150
VI.6.1.	NOESY	150
VI.6.2.	<i>Exo</i> -NOESY	151
VI.	Anexos	153
A.	Programas de pulsos	155
B.	Programa para la determinación de los parámetros de adquisición	174
C.	Programas para la obtención y procesado de los espectros UF-NMR 2D ...	174

Abreviaturas empleadas

En esta Memoria se han empleado acrónimos y abreviaturas recomendados en *Magnetic Resonance in Chemistry* así como otros de uso frecuente en terminología química.

COSY	___	C orrelation S pectroscop Y
DNP	___	D ynamic N uclear P olarization
EPI	___	E cho P lanar I maging
EPSI	___	E cho- P lanar S pectroscopic I maging
FID	___	F ree I nduction D ecay
fMRI	___	f unctional M agnetic R esonance I maging
HMBC	___	H eteronuclear M ultiple B ond C orrelation
HMQC	___	H eteronuclear M ultiple Q uantum C orrelation
HPLC	___	H igh P ressure L iquid C hromatography
HSQC	___	H eteronuclear S ingle Q uantum C oherence
INEPT	___	I nsensitive N uclei by P olarization T ransfer
IRM	___	I imagen de R esonancia M agnética
MATS	___	M ultiple-FID A cquisition T ime- S hared evolution
NOE	___	N uclear O verhauser E ffect
NOESY	___	N uclear O verhauser E ffect S pectroscop Y
NS	___	N úmero de S cans
PALSY	___	P Arallel L ocalized acquisition S pectroscop Y
PANSY	___	P arallel A cquisition N MR S pectroscop Y
PUFSY	___	P arallel U ltrafast S pectroscop Y
ppm	___	p arte p or m illón
RF	___	R adio F recuencia
RMN	___	R esonancia M agnética N uclear
RMN 1D	___	R esonancia M agnética N uclear monodimensional
RMN 2D	___	R esonancia M agnética N uclear bidimensional
SOFAST	___	B and- S elective O ptimized F lip A ngle S hort T ransient
S/R	___	Relación S eñal a R uido
TF	___	T ransformada de F ourier
TOCSY	___	T Otal C orrelation S pectroscop Y
TR	___	T iempo de R epetición
T1	___	T iempo de relajación longitudinal
T2	___	T iempo de relajación transversal
UF	___	U ltra F ast
UF-NMR	___	U ltra F ast N uclear M agnetic R esonance
WATERGATE		W ATER suppression by G rAdient T ailored E xcitation

Nota sobre puntuación

Con el fin de simplificar la publicación de resultados en revistas internacionales que requieren la utilización del sistema científico de puntuación, se ha adoptado este sistema a lo largo de la Memoria de esta Tesis Doctoral. Así, las cifras decimales se indican con puntos en lugar de comas, lo que ha sido aceptado por la Real Academia Española de la Lengua en el *Diccionario Panhispánico de Dudas* desde su primera edición en octubre de 2005.

Nota sobre las referencias bibliográficas

En la presente Memoria, las referencias bibliográficas se encuentran a pie de página. Ineludiblemente existen citas bibliográficas que se han repetido en diferentes páginas al tratar ciertos aspectos, pero se ha decidido mantener este criterio y facilitar en cada apartado la información bibliográfica completa. También se han incluido algunos comentarios y aclaraciones sobre aspectos y nomenclatura específicos de la RMN, así como detalles acerca de la realización de experimentos.

Abstract

ADVANCES IN ULTRAFAST NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (UF-NMR)

Introduction

Multidimensional nuclear magnetic resonance plays a number of essential roles in present day spectroscopy. It is also an integral part of the image formation protocol in magnetic resonance imaging (MRI). Traditional two-dimensional experiments are intrinsically time consuming because many t_1 increments have to be acquired to obtain two-dimensional spectra with adequate digital resolution in the indirect dimension. Proposals for accelerating multidimensional NMR spectroscopy, including non-Fourier transform schemes, the acquisition of multiple NMR spectra in a single experiment, and ultrafast multidimensional NMR spectroscopy, also called UF-NMR, have been introduced. The latter methodology was inspired by echo planar imaging (EPI) and was developed by Frydman et al. It permits the collection of complete multidimensional NMR data sets within a single continuous acquisition.

This new methodology offers an enormous improvement in speed for multidimensional NMR measurements. In this regard, a typical two-dimensional experiment can be completed in less than a second. This attractive feature enables ultrafast NMR to examine dynamic processes, that is, organic reactions and their mechanisms, as they happen in real time. To achieve this goal, some drawbacks related to the management of the technique must be overcome.

Objectives

In this thesis the author first focuses on the implementation of this new technique in standard NMR spectrometers and, secondly, on the evaluation and optimization of the different features of the UF-NMR sequences in order to apply these new methods to the study of organic dynamic systems.

The UF-NMR sequences are not available on commercial spectrometers. Therefore, the pulse programs must be generated. As these sequences don't work in the same way as traditional experiments, it is necessary to develop new programs that calculate the appropriate acquisition parameters and process the acquired data in order to get the UF spectrum.

The first step will be the development of the pulse program to carry out the so-called basic, or mixing-less, UF experiment. The author will write the programs that calculate the acquisition parameters that will yield the desired spectral widths, as well as those necessary for processing the data to obtain the spectrum. Then various spatial-encoding schemes will be evaluated. Different acquisition parameters will be estimated in order to find the sets that yield the optimum spectrum.

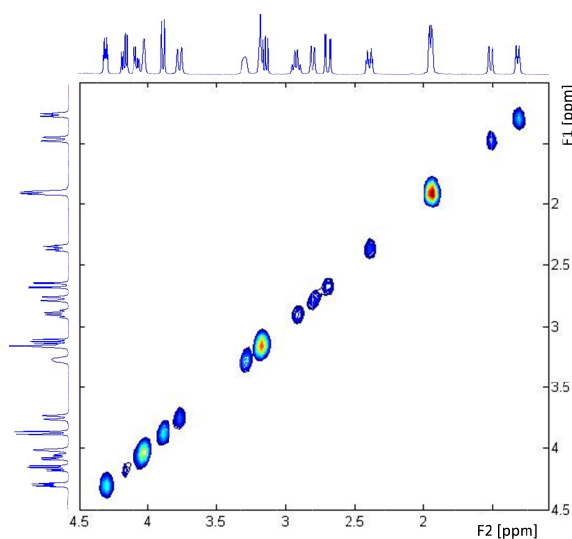
Different homo- and heteronuclear UF sequences will be developed in order to study scalar and dipolar correlations. For each sequence, the optimum parameters will be evaluated.

Finally, based on these sequences, the author will assess the application of these new methods to the study of dynamic systems in real time.

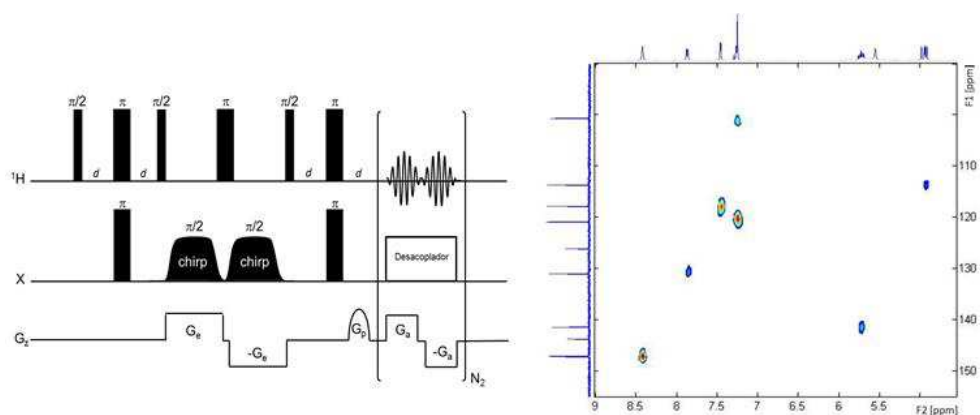
Results

The main results of this work can be summarized as follows:

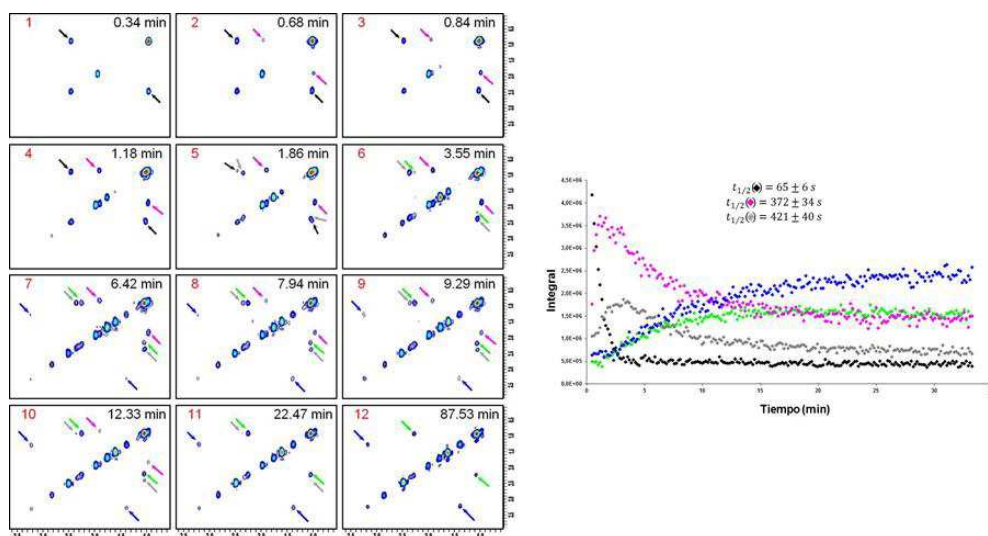
- ✓ In Chapter 1, the completion of the UF mixing-less experiment has been addressed. This implies the following:
 - The development of an interactive program for the calculation of the acquisition parameters. This program has been written using the Matlab package, so it is independent of the NMR equipment.
 - The development of an interactive program for the processing of the acquired data in order to get the UF-NMR spectrum. This program, in addition, can perform different processing steps that improve the spectrum. It is also written in Matlab language.
 - The development of pulse programs to perform the experiment on both 500 and 700 MHz spectrometers. Different spatial-encoding schemes have been examined. The best results for the equipment used were the amplitude-modulated and the constant-time schemes. The optimum acquisition parameters have been studied for each case.



- ✓ In Chapter 2 the author addresses the implementation of different UF-NMR scalar sequences and their applications for monitoring chemical reactions in real time. For this objective, the following steps have been done:
 - Pulse programs for the fulfillment of homonuclear UF-TOCSY and UF-COSY experiments using amplitude-modulated and constant-time schemes have been carried out. Also, heteronuclear UF-HSQC and UF-HMBC sequences were programmed. These sequences have been successfully applied to the monitoring of ^1H , ^{13}C , ^1H , ^{15}N y ^1H , ^{31}P correlations.



- For all of the UF experiments developed, the parameters have been optimized to get the best S/N ratio and resolution.
- The UF-TOCSY sequence has been successfully applied to the study of the reaction between 3-pentanone and triflic anhydride in the presence of acetonitrile- d_3 . The reaction was performed in a 5 mm NMR tube inside a standard 500 MHz spectrometer. In 87 minutes, 525 experiments were acquired, with data being recorded every 10 s. The evolution of the reactants, presence of intermediates, and generation of reaction products were observed.

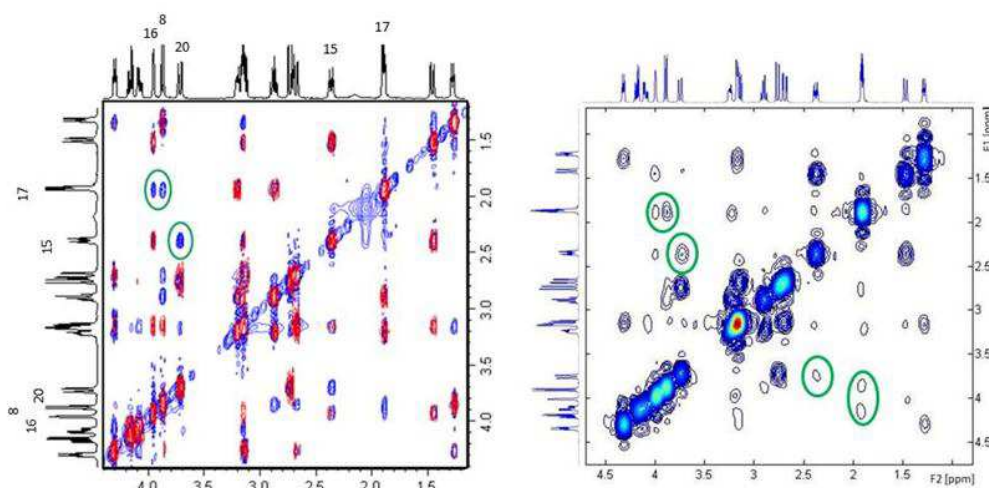


- UF 2D HMBC spectroscopy has permitted real-time monitoring of a similar reaction. In 112 minutes, 428 experiments were acquired. This technique has allowed the detection of different intermediate species based on the structural changes produced in a carbonyl carbon atom, thereby, providing relevant information about new intermediates and kinetic data.
- Finally, a combined homo/heteronuclear (UF-TOCSY/HMBC) correlation sequence was applied to the study of a dynamic system. The combined study of the total scalar correlations $^nJ_{\text{HH}}$, $^1\text{-}^3J_{\text{HC}}$ gives more detailed and exhaustive information about the presence and structural properties of

possible intermediates and products formed as the chemical reaction progresses.

✓ In Chapter 3, UF experiments for the detection of dipolar interactions were carried out. The results were as follows:

- New UF-NOESY sequences have been created. These sequences are based on both amplitude-modulated and constant-time spatial-encoding schemes. The acquisition parameters for both sequences were examined to get the best results. The obtained spectra show clearly the dipolar correlations of strychnine.



- Due to the high signal intensity of the diagonal compared to the signal intensity of the correlation peaks, these new strategies to improve visualization of the correlation peaks have been developed:

- ✓ Successful results have been obtained by subtracting the UF-mixing less or UF-TOCSY signal from the UF-NOESY data during the acquisition.
- ✓ At the same time, a new sequence, called UF-ExoNOESY, has been created. This sequence uses selective pulses so that different parts of the UF-NOESY spectrum can be studied. As a result, clearer dipolar correlation spectra than those obtained with the UF-NOESY sequence are yielded.

✓ In Chapter 4, improvements in the process programs are presented. The new programs allow obtaining optimized UF spectra. All the programs are integrated in a graphic interface so the user can work easily. They are written in Matlab language; therefore, they are independent of the NMR system.

- Apart from the basic processing that the first program already carried out, the new version includes other possibilities of preprocessing, such as forward linear prediction, and postprocessing, such as filtering the signal using different functions in both dimensions.

- Because the UF-NMR sequences are appropriate to the study of dynamic systems, a new feature for processing dynamic experiments has been integrated. This feature allows the user to process all the spectra at the same time in the same way and record them as a video sequence.

Conclusions

The results presented in this work show the excellent feasibility of this promising technique, which can be implemented in any standard spectrometer. It opens valuable routes to kinetic monitoring and characterizing of dynamic chemical systems, as well as clarifying the mechanisms underlying these transformations.

I. Introducción



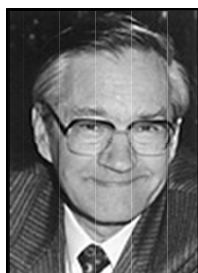
El experimento crucial en la prehistoria de la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se realizó en 1939 cuando el grupo del Prof. Isidor I. Rabi (Universidad de Columbia) diseñó nuevas técnicas de haces moleculares (carentes de espín electrónico) que permitieron por primera vez la medición del momento magnético del protón. Había nacido la RMN, aunque Rabi la nombrara como Espectroscopía de Radiofrecuencia y no llegara a suponer las decisivas consecuencias que posteriormente tendría su descubrimiento. Debido a su importancia, le fue concedido el Premio Nobel de Física en 1944.



La RMN comenzó a desarrollarse en la década de 1940 gracias al trabajo de los grupos de los Profs. Felix Bloch (Universidad de Stanford) y Edward M. Purcell (Universidad de Harvard), siendo galardonados con el Premio Nobel de Física en 1952.^{1,2,3}

El fundamento físico de la técnica se basa en la propiedad de los núcleos de ciertos elementos que, en presencia de un campo magnético, son capaces de absorber radiación electromagnética que será devuelta al medio durante la posterior relajación al estado de equilibrio.

La RMN permite investigar la estructura y la dinámica de la materia de un modo no invasivo y estudiar las propiedades moleculares y las interacciones con un detalle sin precedentes. A ello ha contribuido decisivamente el desarrollo de la espectroscopía de RMN multidimensional, conceptualmente expuesta por Jan Jeener en uno de los trabajos sin publicar más citados del mundo, durante el congreso Ampère en 1971.⁴ Esta nueva perspectiva se benefició de forma inmediata del enorme avance que supuso la introducción de la resonancia basada en la aplicación de pulsos y de la transformada de Fourier.



El desarrollo de la RMN multidimensional encontró en el grupo del Prof. Richard R. Ernst (ETH de Zürich) un pilar fundamental⁵ que dio lugar a las secuencias y aplicaciones homo y heteronucleares, espectroscopía J, secuencias de pulsos, excitaciones selectivas y un largo etcétera, que han permitido abordar un enorme número de estudios estructurales y de procesos de intercambio químico y topológico. Por su decisiva contribución, fue galardonado con el Premio Nobel de Química del año 1991. El Prof. Kurt Wütrich (ETH de Zürich) dio un pulso adicional a la utilización de la RMN al desarrollar el método que ha permitido estudiar la estructura y propiedades de moléculas esenciales para la vida como son las proteínas. Por ello recibió el Premio Nobel de Química en 2002.

En 1972 Paul Lauterbur y Peter Mansfield encontraron que el fenómeno de la RMN podía emplearse en la generación de una imagen bidimensional que refleja la densidad de núcleos presente en una muestra.^{6,7} Cuando se establece un gradiente de campo

¹ Bloch, F. Nuclear Induction. *Phys. Rev.* **1946**, 70, 460-474.

² Bloembergen, N.; Purcell, E. M.; Pound, R. V. *Phys. Rev.* **1948**, 73, 679-712.

³ Purcell, E. M.; Torrey, H. C.; Pound, R. V. *Phys. Rev.* **1946**, 69, 37-38.

⁴ Jeener, J. Ampère International Summer School II, Basko Polje, Yugoslavia, Septiembre 1971.

⁵ Aue, W. P.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2229-2246.

⁶ Lauterbur, P.C. *Nature* **1973**, 242, 190-191.

⁷ Mansfield, P.; Grannell, P. K. *J. Phys. C.* **1973**, 6, 422-426.

magnético a lo largo de una muestra localizada en el interior de un campo magnético, a cada posición en el espacio le corresponde una frecuencia de resonancia nuclear diferente. Por tanto, el análisis de las frecuencias de la señal de RMN proporcionará



información de la posición y de la densidad nuclear correspondiente. El análisis no invasivo de áreas y procesos esenciales del cuerpo humano, que puede ser llevado a cabo mediante técnicas de Imagen de Resonancia Magnética (IRM), constituye uno de los capítulos más apasionantes y con mayor futuro de la investigación médica y de las aplicaciones clínicas.

No es frecuente que una técnica instrumental siga siendo objeto de tanta investigación fundamental a los 60 años de su nacimiento y menos aún que continúen aumentando sus aplicaciones en el desarrollo de las *biociencias*, *materiales*, *geología*, *estudios con alimentos*, etc. en los que se puede aplicar la RMN como técnica no invasiva.

La Memoria que se presenta pretende contribuir al desarrollo y aplicaciones de la RMN abordando para ello la descripción de nuevos métodos que ayuden a superar el inconveniente de los largos tiempos de experimentación que presenta la RMN multidimensional.

II. Antecedentes

II.1. Características de la RMN clásica^{8 9,10}

En la espectroscopía monodimensional de RMN (RMN 1D) medimos las frecuencias de precesión de los espines de la muestra. Estas frecuencias se corresponden con el campo magnético inducido en el núcleo por su entorno. Por ello, estos valores nos dan información acerca de la estructura, la configuración y la dinámica de las moléculas.

En la espectroscopía RMN 1D la muestra es sometida a la acción de un pulso de radiofrecuencia (RF) con las características adecuadas de potencia y duración que permite la excitación del sistema. Tras el pulso se genera una curva de inducción o FID (por su nombre en inglés, *free induction decay*) que decae con el tiempo, la cual es sometida a un proceso de adquisición, digitalización y almacenamiento. Este proceso puede repetirse hasta que los datos obtenidos poseen la intensidad suficiente, dando lugar a una FID acumulativa. Los datos obtenidos se encuentran en el dominio del tiempo. LA FID por tanto depende de una única variable temporal t_2 . Es necesario transformar esta información al dominio de las frecuencias para extraer la información espectroscópica y su correlación estructural. Para ello se lleva a cabo la transformada de Fourier de la FID, generando así el espectro monodimensional.

En la figura II.1 se muestra gráficamente este proceso, en el que un pulso de RF induce la FID que, en caso necesario se acumula hasta obtener la señal deseada, cuya transformada constituye el espectro de RMN 1D.

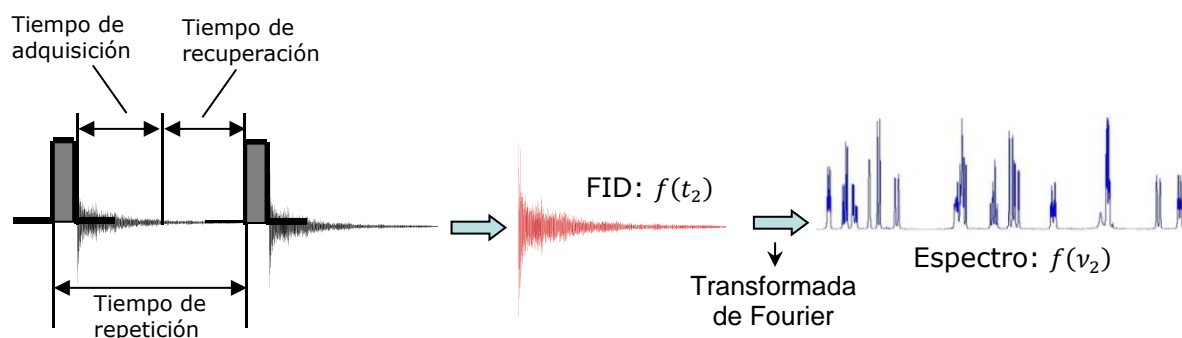


Figura II.1. Esquema básico de la RMN 1D: un pulso de RF de excitación induce la FID que puede ser acumulada. La transformada de Fourier de la FID da lugar al espectro en frecuencias de todos los espines de la muestra.

En un espectro monodimensional, p.e. de ^1H -RMN, se encuentra toda la información molecular relativa a diferentes factores estructurales. Esto puede dar lugar a espectros monodimensionales de complejidad adecuada para ser estudiados de forma directa, como el de la *quinidina* (figura II.2). Pero también se obtienen frecuentemente espectros muy complejos y metodológicamente inabordables, como el que se muestra en la figura II.3.

Según aumenta la complejidad de la estructura molecular, particularmente en moléculas biológicas, el espectro y la resolución química de la RMN 1D se hace deficiente. Una solución a este problema es la dispersión de los datos de RMN en múltiples dimensiones. Estos experimentos se desarrollaron a partir del esquema propuesto por J.

⁸ Keeler, K. *Understanding NMR Spectroscopy*; Willey: Chichester, Inglaterra, 2005.

⁹ Claridge, T. D.W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*; Pergamon: Amsterdam, 1999.

¹⁰ Berger, S.; Braun, S. *200 and More NMR Experiments*; Wiley-VCH: Weinheim, 2004.

Jeener a principio de los 70¹¹ y fueron generalizados por R. R. Ernst y sus colaboradores¹².

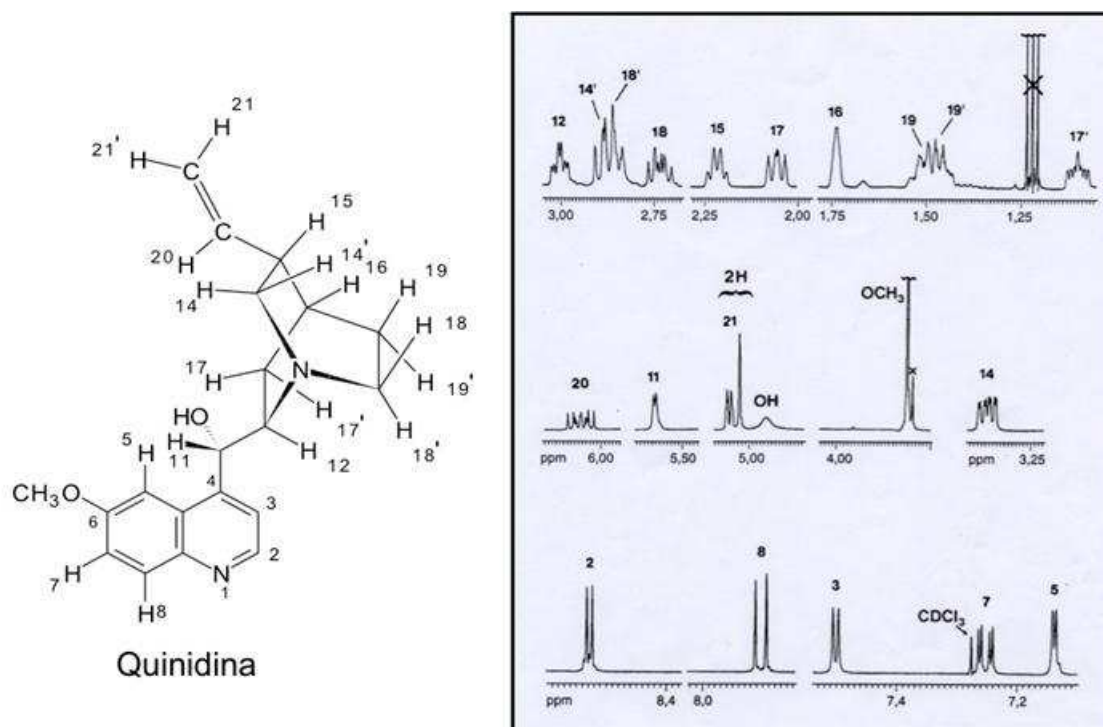


Figura II.2. La molécula de *quinidina* posee una estructura similar a la de la *quinina* y se utiliza como antimalárico. A la derecha se aprecian diferentes zonas del espectro de ¹H-RMN de la *quinidina*. Las señales de resonancia no poseen una gran complejidad por lo que es posible estudiar cada una de ellas y asignarla al protón correspondiente de dicha molécula.

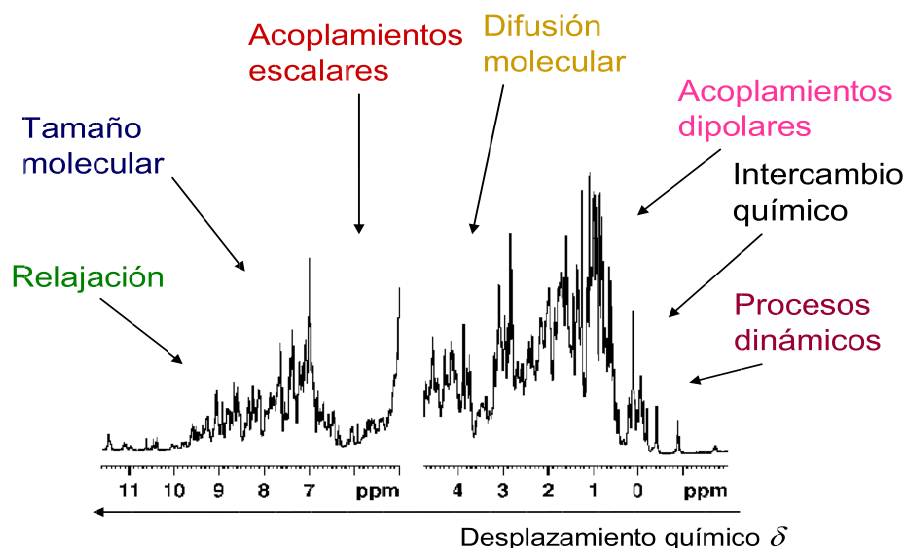


Figura II.3. Espectro de RMN ¹H-RMN de la *flavodoxina* en el que se aprecia una gran complejidad. Dicha complejidad puede deberse a diferentes factores como los que se han señalado en la figura.

¹¹ Jeener, J. Ampere International Summer School II, Basko Polje, Yugoslavia, Septiembre 1971.

¹² Ernst, R. R.; Anderson, W. A. *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, 37, 93-102.

En la espectroscopía de Resonancia Magnética bidimensional (RMN 2D) la FID depende de dos variables temporales. La primera continúa siendo el tiempo de adquisición t_2 de los experimentos de RMN 1D. La segunda es una nueva variable temporal t_1 , denominado *tiempo de evolución*, que se introduce en la secuencia previamente a la toma de datos en la FID y que aumenta progresivamente. Por tanto, los experimentos de RMN 2D consisten en la adquisición de una serie de espectros 1D en los que el tiempo de evolución t_1 aumenta secuencialmente entre ellos. La FID es una función de las dos variables temporales t_1 y t_2 . De esta forma, tras la aplicación de la transformada de Fourier, los espectros bidimensionales serán por tanto función de dos variables en el dominio de las frecuencias, $f(\nu_1, \nu_2)$.

El experimento de RMN 2D comienza con un pulso de RF para excitar los espines y desplazarlos al plano xy . A la excitación le sigue un periodo de evolución de duración t_1 , que aumenta en cada repetición de la secuencia; seguidamente se aplica una etapa de mezcla adecuada al experimento deseado y finalmente se adquiere una señal, que es proporcional a la magnetización transversal de los espines durante el tiempo de adquisición t_2 . Cada valor de t_1 requiere una repetición de la secuencia y una adquisición independiente como función del tiempo t_2 . Los datos obtenidos constituyen un conjunto que depende de las dos variables temporales t_1 y t_2 , por lo que para la obtención del espectro se ha de realizar la transformada de Fourier a lo largo de las dos dimensiones temporales. En la figura II.4 se reflejan las etapas de una secuencia de pulsos de RMN 2D homonuclear en el que los dos ejes corresponden al mismo núcleo. También se pueden utilizar canales simultáneos de radiofrecuencia, cada uno trabajando a la frecuencia de resonancia de un núcleo particular. Estaremos entonces ante la espectroscopía de RMN 2D heteronuclear. En estas secuencias el núcleo sensible (p.e. ^1H , I) posibilita la observación del heteronúcleo menos sensible (S) mediante la transferencia de polarización.¹³

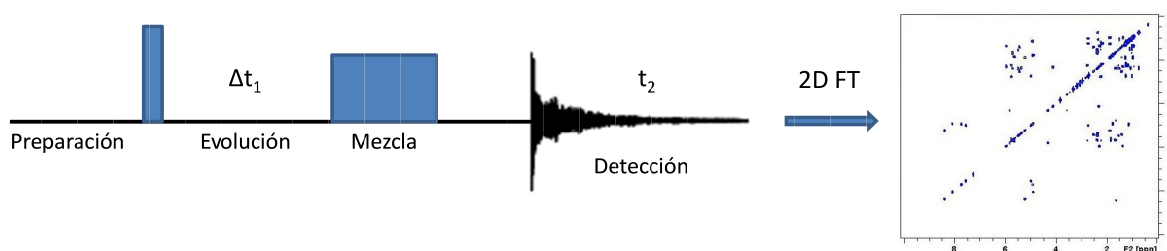


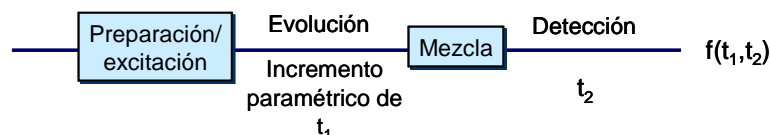
Figura II.4. Esquema de un experimento de RMN 2D homonuclear. Tras la preparación y el pulso de excitación se introduce el tiempo de evolución t_1 . Le sigue una etapa de mezcla adecuada para el experimento deseado, tras lo que se adquiere la señal según el tiempo t_2 del mismo modo que se hace en el experimento de RMN 1D. La secuencia se repite, de modo que en cada repetición el tiempo de evolución se varía secuencialmente. Finalmente a los datos así obtenidos se les aplica una doble transformada de Fourier dando lugar a un espectro que depende de dos variables en el dominio de frecuencias $f(\nu_1, \nu_2)$.

Las secuencias de mezcla del experimento 2D se diseñan de acuerdo con el tipo de interacción y/o la información que se desea obtener. Cuando a pesar de las enormes posibilidades que ofrece la RMN 2D el experimento no alcanza la resolución adecuada, se puede recurrir a una dimensionalidad superior mediante la RMN 3D, 4D etc.

¹³ La transferencia de polarización consiste en lograr el aumento de intensidad de las señales de núcleos con constante giromagnética y abundancia natural pequeñas, mediante la transferencia de las diferencias de población de los estados energéticos de un núcleo con una elevada constante giromagnética a dichos núcleos.

II.2. Secuencias rápidas de RMN

En la espectroscopía de RMN bidimensional se requiere que el esquema empleado en la RMN 1D se repita empleando diferentes valores de t_1 . Por tanto para obtener el espectro deseado habrá de repetirse N_1 veces.



El gran inconveniente de este esquema de adquisición, aunque extremadamente robusto, es el tiempo de adquisición, el cual depende fundamentalmente del número de pasos necesarios para obtener un muestreo suficiente, más que de la sensibilidad. Por otro lado, ya que para maximizar la respuesta de estado estacionario de la serie de valores de t_1 debemos esperar un tiempo aproximadamente igual a T_1 antes de repetir el experimento con un valor diferente de t_1 , la adquisición de un espectro 2D completo puede llevar minutos, horas, etc. simplemente sobre la base del muestreo en el dominio indirecto. El tiempo de adquisición que depende de una serie de variables experimentales crece exponencialmente según aumenta el número de dimensiones del experimento, como puede observarse en la figura II.5, y su disminución ha sido el tema de grandes esfuerzos realizados a lo largo de los últimos años

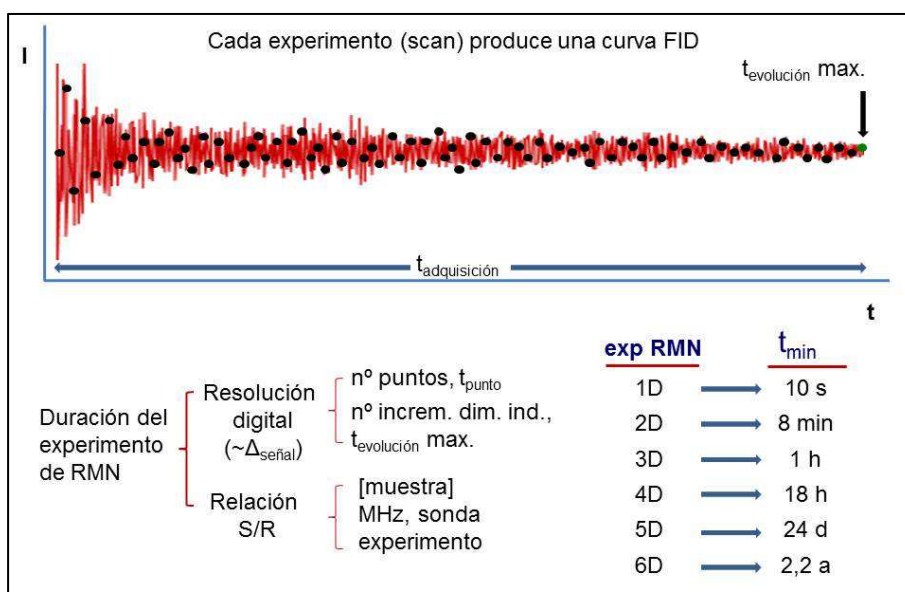


Figura II.5. En cada experimento de RMN se produce una curva de inducción o FID (*free induction decay*) que se muestrea a lo largo del tiempo. La duración de dicho muestreo dependerá de la resolución (nº de puntos muestreados, tiempo de muestreo, anchura espectral, etc.) y de la relación S/R (número de acumulaciones) deseada. Ello da lugar a tiempos de experimentación que en el caso de una sola dimensión serán del orden de los segundos, en el caso de dos dimensiones del orden de los minutos, y que aumentan exponencialmente con el número de dimensiones del experimento como podemos observar en la figura.

De hecho, la reducción de los tiempos de experimento tan largos sería un gran beneficio no sólo desde el punto de vista práctico del tiempo de adquisición sino también

desde uno fundamental: los tiempos largos de adquisición hacen imposible la monitorización dinámica de las reacciones que ocurren en escalas de tiempo reducidas, como pueden ser el plegamiento de proteínas o las reacciones de intercambio químico de biomoléculas químicamente inestables, o el uso de estados metaestables de los espines, tales como los que surgen de los procesos de hiperpolarización.

Es evidente la necesidad de nuevos esquemas para la adquisición de espectros de RMN nD en tiempos inferiores sin que ello implique una disminución de la intensidad y resolución. Para la implementación de la estrategia adecuada, hay que tener en cuenta la distribución o *escala de tiempos* del experimento de 1D de RMN (figura II.6).

En el esquema de tiempos de la figura II.6 se aprecia cómo tras la etapa de aplicación de una secuencia de pulsos, con una duración media aproximada de milisegundos, se encuentra la de adquisición de la FID. La duración conjunta de ambas etapas es de 0,8-1,0 segundos. A partir de este momento queda un camino, a veces largo, que hay recorrer hasta que el sistema se relaja longitudinalmente. En sistemas favorables ello supone 1-2 segundos.

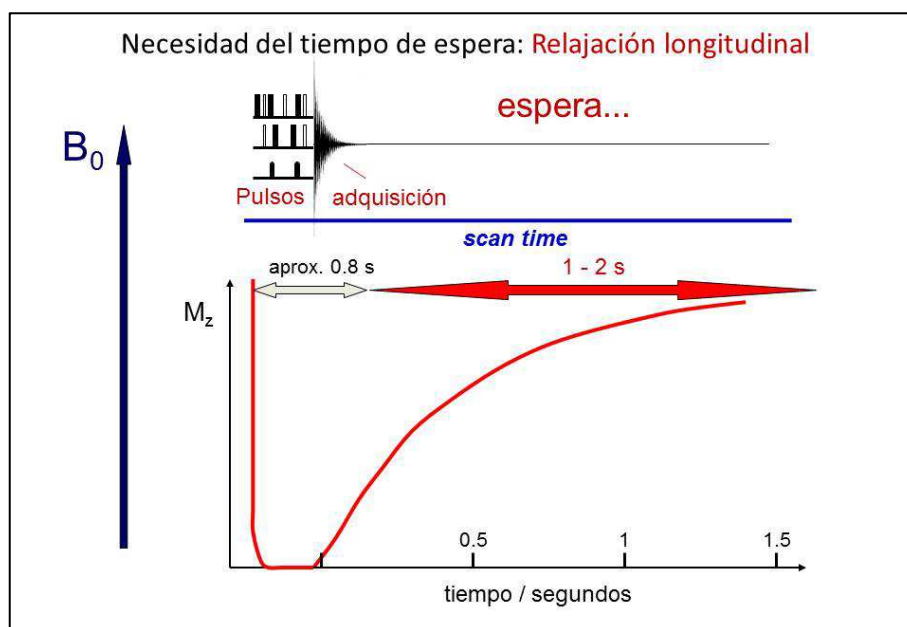


Figura II.6. Esquema de tiempos y etapas en el experimento de RMN

De esta forma, por todo lo expuesto anteriormente y teniendo en cuenta las características y escala de tiempos de los experimentos de RMN, se han descrito diferentes técnicas rápidas para la aceleración de los experimentos de RMN, que se pueden agrupar en dos grandes estrategias¹⁴ mostradas en la figura II.7.

1) **Técnicas Rápidas de Pulsos**, que están basada en la optimización del tiempo de adquisición del experimento. Se incluye aquí la denominada *Polarización Nuclear Dinámica* (DNP).

2) **Técnicas de Muestreo Rápido**, que se fundamentan en la optimización del número de puntos o datos que se adquieren. Dentro de ellas se ha incluido la RMN ultrarrápida (UF-NMR). Aunque ésta puede considerarse como una técnica de muestreo

¹⁴ Felli, I. C.; Brutscher, B. *ChemPhysChem*. **2009**, *10*, 1356-1368.

rápido, implica un cambio completo y novedoso de la estrategia de adquisición de los datos de RMN.

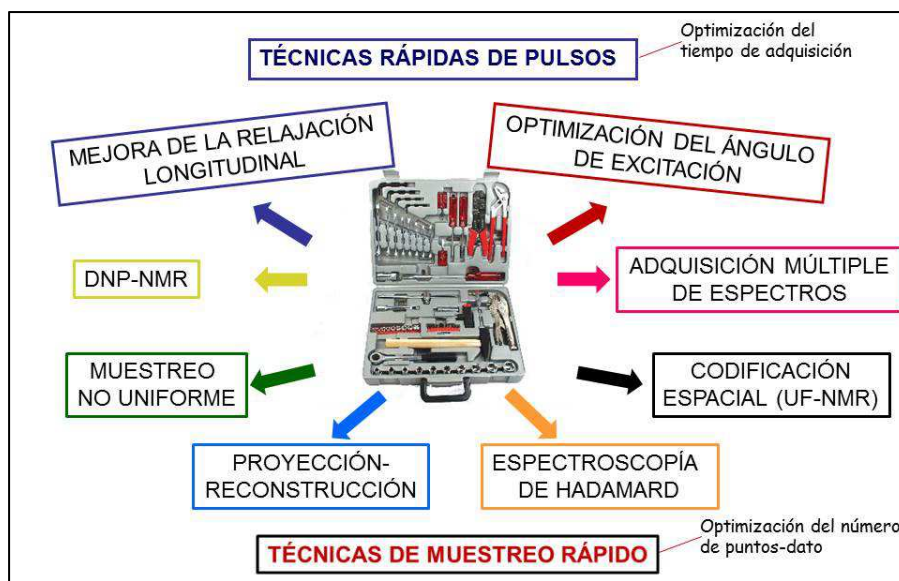


Figura II.7. Diferentes técnicas propuestas para la aceleración de los experimentos de RMN.

II.2.1. Técnicas rápidas de Pulsos

Tal y como se mostró en la figura II.6, es durante el periodo de relajación de la muestra donde podemos conseguir la mayor disminución del tiempo de adquisición. Se trata pues de disminuir el tiempo de espera entre barridos sucesivos para aumentar la velocidad de repetición de la secuencia y conseguir así acumular el mayor número de *scans* en el menor tiempo posible. La utilización de compuestos de Cr como reactivos de relajación constituye una conocida alternativa en RMN en estado líquido.¹⁵ Desde un punto de vista de las secuencias de RMN se han descrito recientemente diferentes aproximaciones. Seguidamente se comentan las más destacables:

II.2.1.1. El experimento SOFAST^{16,17} Consiste en la irradiación selectiva y optimizada de un tipo determinado de protones de la muestra. Al excitar selectivamente un tipo determinado de protones de la muestra, éstos verán aumentado su contenido energético y podrán ceder su exceso de energía (relajarse) interaccionando con otros núcleos no excitados a través de la interacción dipolar (NOE) (figura II.8). Así pues se observará un aumento en la velocidad de relajación de los núcleos excitados selectivamente.

¹⁵ Berger, S.; Braun, S. *200 and More NMR Experiments*; Wiley-VCH: Weinheim 2004.

¹⁶ Schanda, P; Brutscher, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8014-8015.

¹⁷ Schanda, P; Kupče, E.; Brutscher, B. *J. Biomol. NMR.* **2005**, *33*, 199-211.

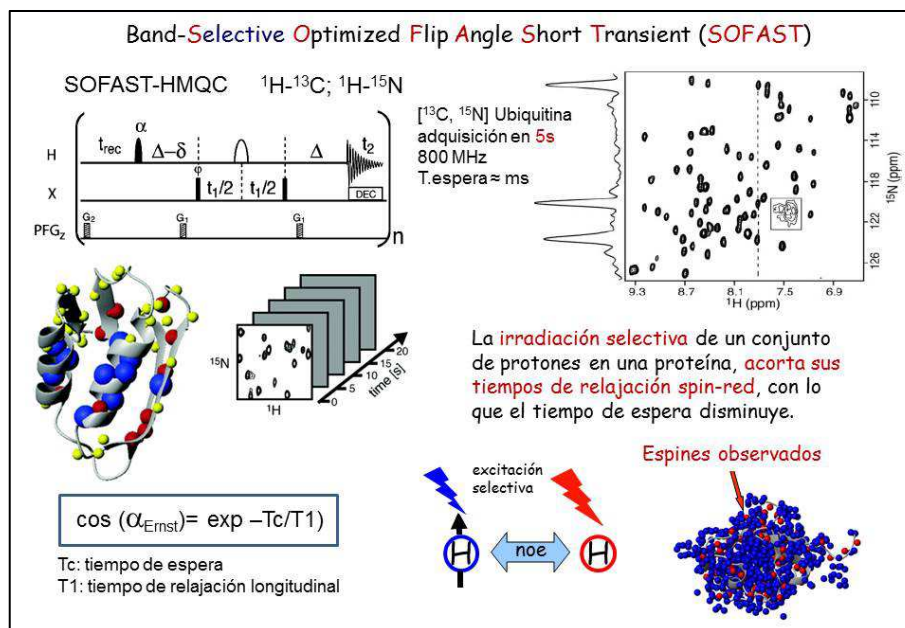


Figura II.8. Características principales de la secuencia SOFAST-HMQC. La técnica emplea pulsos selectivos para irradiar ciertos protones de la muestra como se muestra en el esquema de la secuencia. Éstos verán su tiempo de relajación disminuido debido al uso de pulsos con ángulos menores a 90° y a la interacción dipolar con otros núcleos que no han sido irradiados. Esta disminución del tiempo de relajación permite la reducción del tiempo de repetición de la secuencia y por tanto del tiempo total del experimento HMQC.

Este experimento, denominado *SOFAST* (Band-Selective Optimized Flip Angle Short Transient), es un claro ejemplo del sorprendente efecto que se produce al variar adecuadamente parámetros experimentales, lo que conduce a reducciones en el tiempo de relajación longitudinal desde un valor de algunos segundos al de pocos centenares de milisegundos. La secuencia hace uso de pulsos de excitación inicial menores de 90° , calculados mediante la ecuación de Ernst.^{18,19} De esta forma se ha conseguido el registro de un espectro HMQC a partir de una muestra de *ubiquitina* 1 mM en un tiempo de 12 minutos.

II.2.1.2. Adquisición múltiple mediante evolución compartida (MATS)²⁰

El grupo del Dr. Teodor Parella (UAB) ha desarrollado la secuencia *MATS* (Multiple-FID Acquisition Time-Shared evolution), con la que se obtienen hasta 4 espectros con un único período de excitación. Ello se consigue compartiendo la etapa de evolución y empleando una selección de las magnetizaciones adecuadas mediante los gradientes G_4 y G_5 (figura II.9). La ganancia del tiempo de adquisición es del 75% en cada espectro.

¹⁸ Ernst, R. R.; Bodenhausen, G. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*; Oxford University Press: Londres, 1987.

¹⁹ Ross, A.; Salzmann, M.; Senn, H. J. *Biomol. NMR*. **1997**, *10*, 389-396.

²⁰ Nolis, P.; Pérez-Trujillo, M.; Parella, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7495-7497.

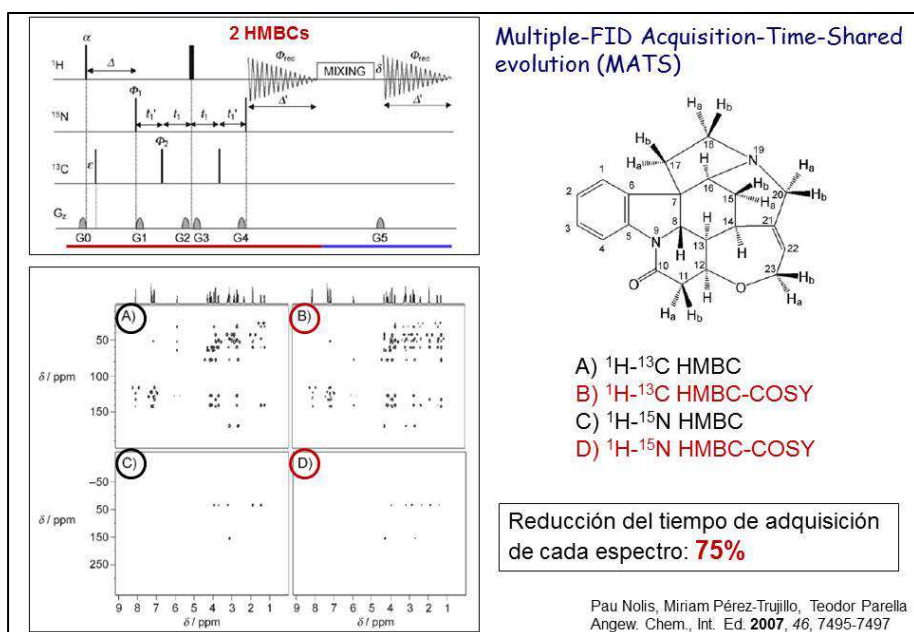


Figura II.9. Esquema de la secuencia MATS.

II.2.1.3. Espectroscopía paralela localizada (PALS_Y)²¹

La secuencia *PALS_Y* (Parallel Localized acquisition Spectroscopy), desarrollada por el grupo del Prof. M. Martín-Pastor (USC), consiste en la realización de una selección de corte mediante el empleo de gradientes. La muestra de resonancia se divide en cortes (1, 2, 3) (figura II.10) cada uno de los cuales se usará para el registro de un espectro diferente. Aquí se muestran los espectros 2D DQF-COSY estándar y *PALS_Y* 2D DQF-COSY. Con esta método se consiguen registrar hasta 4 espectros simultáneos que se obtienen en un tiempo 3-4 veces inferior al de la resonancia estándar.

II.2.1.4. Espectroscopía de detección en paralelo (PANS_Y)^{22,23}

Otra alternativa a la adquisición múltiple de experimentos de RMN lo constituye la denominada espectroscopía *PANS_Y* (Parallel Acquisition NMR Spectroscopy), que hace uso de detectores múltiples para la adquisición de diferentes espectros 2D homo y/o heteronucleares. La ganancia de tiempo es evidente, como muestra el ejemplo de la figura II.11 y los espectros H,H-TOCSY y HSQC obtenidos simultáneamente a partir de una muestra de brucina. La disposición de múltiples receptores si bien encarece el coste del espectrómetro es claramente una opción de futuro.

²¹ Vega-Vázquez, M.; Cobas, J. C.; Martín-Pastor, M. *Magn. Reson. Chem.* **2010**, 48, 749-752.

²² Kupče, E.; Freeman, R. J. *Magn. Reson.* **2011**, 213, 1-13.

²³ Kupče, E.; Freeman, R.; John, B.K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 9606-9607.

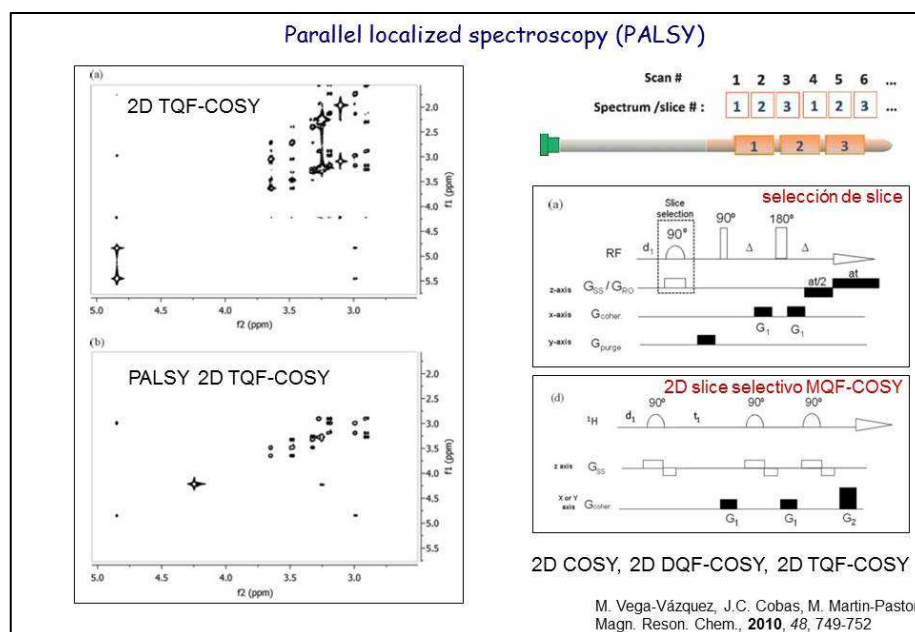


Figura II.10. Esquema de la secuencia PALS. Esta secuencia divide la muestra en cortes mediante el uso de gradientes y pulsos selectivos adecuado (a derecha). De cada uno de estos cortes se registra un experimento diferente (d derecha). A la izquierda de la figura podemos ver el experimento 2D TQF COSY tradicional (a) comparado con el experimento obtenido mediante la técnica PALS (b).

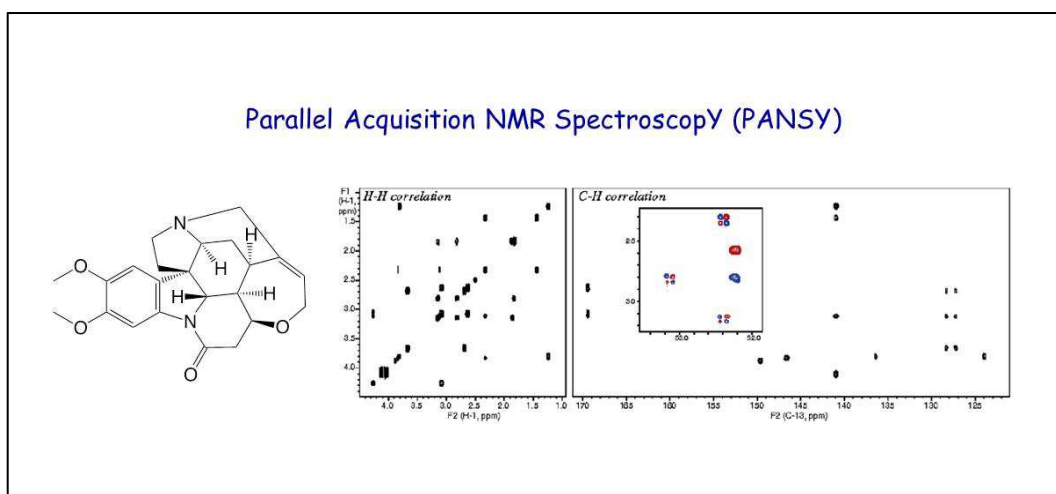


Figura II.11. Adquisición en paralelo de espectros H,H-TOCSY y H,C-HSQC con una muestra de brucina (3% en CDCl_3), registrados a 600 MHz en 40 min.

II.2.1.5. Polarización Nuclear Dinámica (DNP)^{24,25}

La similitud entre poblaciones en condiciones de equilibrio térmico es la causa de la baja sensibilidad de la RMN. La *hiperpolarización* consigue aumentar la diferencia de poblaciones entre el estado fundamental y el excitado, lo que da lugar a un gran aumento de intensidad de la señal de resonancia en relación a la alcanzada en condiciones de equilibrio térmico (figura II.12).

²⁴ Ardenkjær-Larsen, J. H.; Fridlund, B.; Gram, A.; Hansson, G.; Hansson, L.; Lerche, M. H.; Servin, R.; Thaning, M.; Golman, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2003**, 100, 10158-10163.

²⁵ Slichter, C.P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 5741-5751.

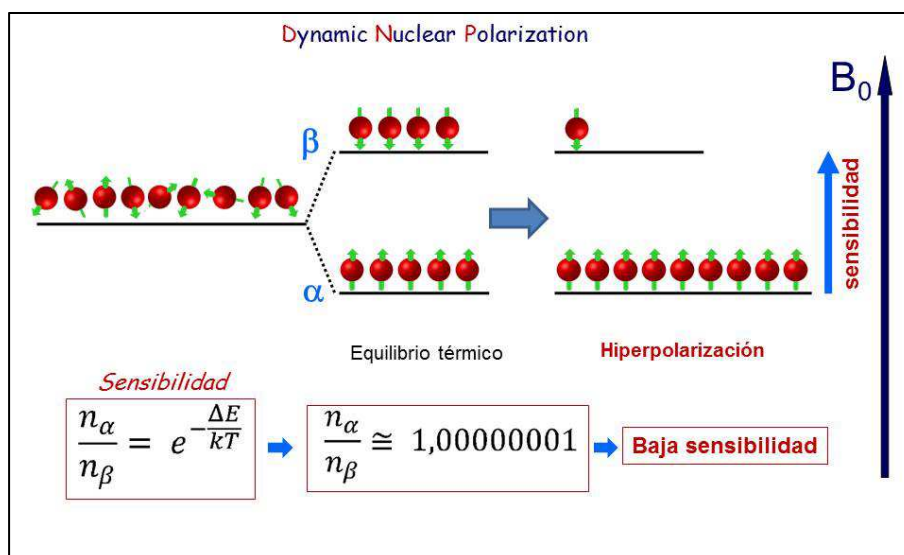


Figura II.12. La similitud de poblaciones de los estados fundamental y excitado en el estado de equilibrio es la causa de la baja sensibilidad de la RMN. Mediante las técnicas de hiperpolarización es posible aumentar la diferencia entre ambos estados lo que produce un drástico aumento de la señal de RMN.

La *DNP* se basa en los estudios realizados por Albert W. Overhauser (1925-2011) quien al año siguiente de leer su Tesis Doctoral (1951), aportó la teoría del *efecto Overhauser*. Éste consiste en la interacción que se establece entre radicales y núcleos atómicos cuando se saturan los niveles de resonancia paramagnética electrónica mediante radiación de microondas. Tiene lugar una interacción entre electrones desapareados y núcleos atómicos, que es proporcional al producto de sus momentos magnéticos e inversamente proporcional a su distancia (figura II.13).

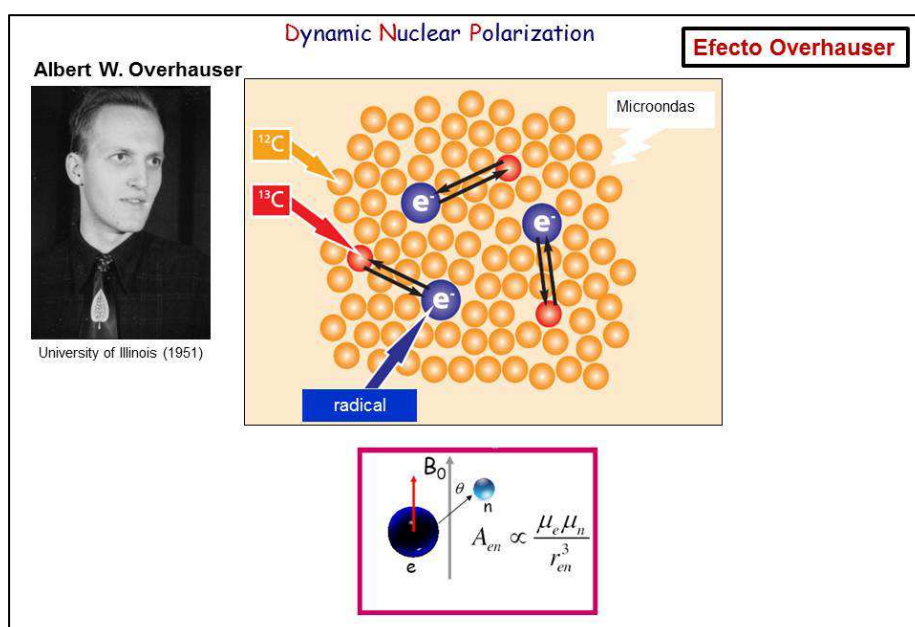


Figura II.13. *Efecto Overhauser*: efecto de la radiación con microondas sobre electrones desapareados y núcleos atómicos.

Al saturar las transiciones electrónicas se igualan las poblaciones de modo que parte de la población de los niveles electrónicos de partida pasa a los de llegada. El

sistema gana en energía y se encuentra así en una situación de no equilibrio. Los espines electrónicos equilibran la situación y debido al acoplamiento o interacción con los nucleares propician la *relajación* de éstos. Con ello aumenta la población del estado de inferior energía en un factor igual al cociente entre los momentos magnéticos de los espines electrónico y nuclear, que es aprox. 1000. Esta es la razón del aumento de intensidad debido a la hiperpolarización, aumento de intensidad análogo al que se produce en el Efecto Overhauser Nuclear, en el que se fundamenta una parte sustancial de la RMN.

Basándose en este principio un equipo para DNP-NMR consta de un polarizador en el que se produce la polarización de la muestra en un imán de 3,5T, a 4K mediante la acción de un radical (p.e. tritilo). Se irradia la mezcla con microondas a 94GHz durante un tiempo (60-90 min) y la muestra *hiperpolarizada* se transfiere al equipo de RMN para realizar el experimento (figura II.14). Los aumentos de sensibilidad producidos son espectaculares, proporcionales al cociente de relaciones giromagnéticas entre el electrón y el núcleo observado (^{13}C -RMN ~ 660 ; ^{15}N -RMN ~ 2600).

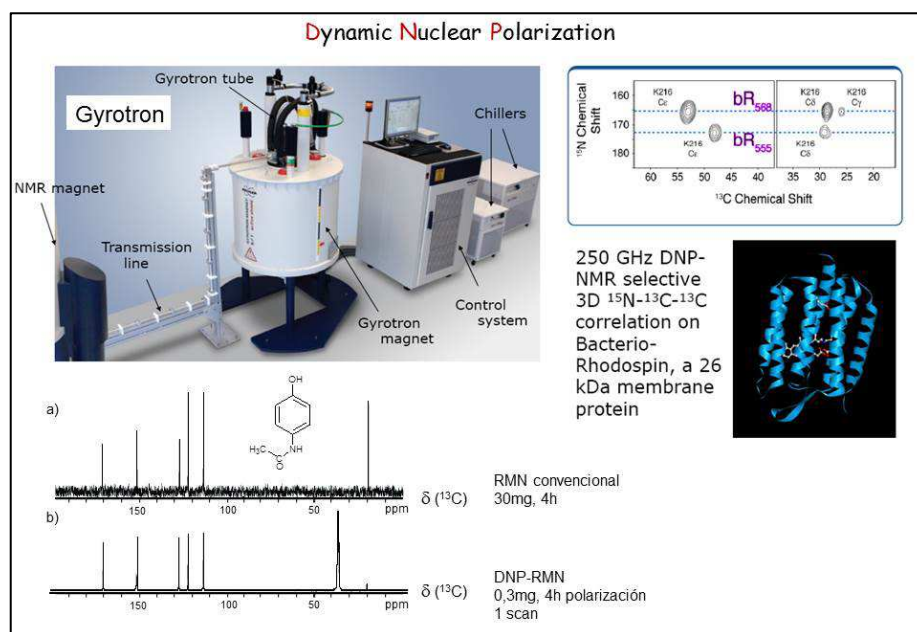


Figura II.14. Imagen de un equipo DNP-RMN. Correlación ^{15}N , ^{13}C obtenida a partir de una muestra de *Bacterio-Rhodospina* y resultados comparativos en el registro de un espectro de ^{13}C -RMN.

II.2.2. Técnicas de muestreo rápido

Estas técnicas se fundamentan en la disminución del número de datos registrados en el experimento, que se traduce en una disminución proporcional del tiempo necesario para la adquisición del experimento. La figura II.15 muestra algunas de las diferentes estrategias empleadas.²⁶

²⁶ Felli, I. C.; Brutscher, B. *ChemPhysChem*. **2009**, *10*, 1356-1368.

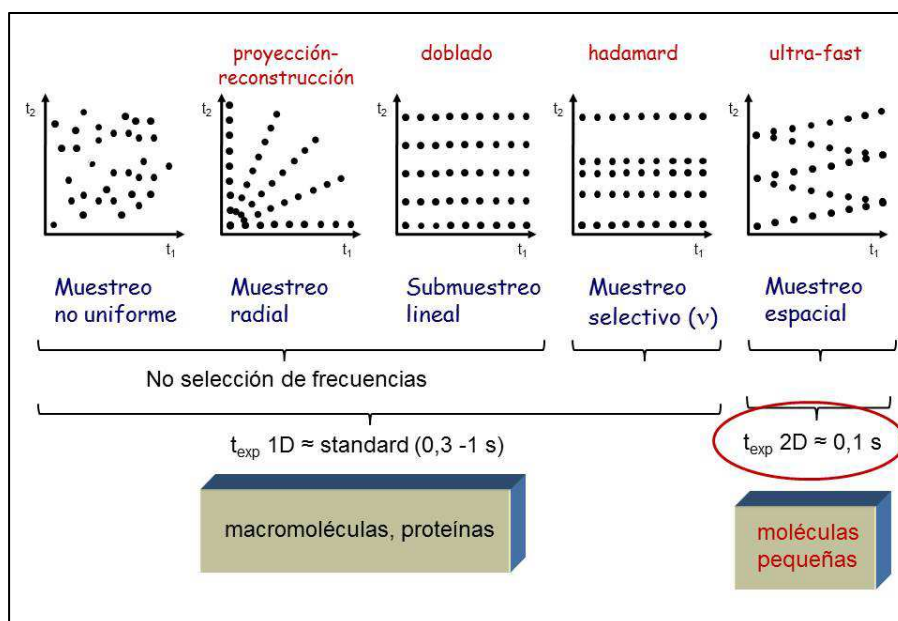


Figura II.15. Esquemas de las diferentes técnicas de muestreo utilizadas para la adquisición rápida de espectros de RMN.

II.2.2.1. Muestreo sin selección de frecuencias

El procedimiento más sencillo para reducir el tiempo de adquisición de un experimento multidimensional de RMN consiste en la adquisición de un número reducido de espectros en los que las parejas de valores (t_1 , t_2) que definen el experimento se seleccionan al azar (muestreo no uniforme, figura II.15). De esta forma se adquieren entre el 10 y el 30% de los puntos. La obtención del espectro no puede realizarse a través de la transformada de Fourier, sino que se realiza mediante otros procedimientos como el de reconstrucción de máxima entropía^{27,28} o el de filtrado por diagonalización.²⁹ En la práctica, requieren un procesamiento laborioso, el empleo de algoritmos de cálculo complicados y ajustes de parámetros que implican un conocimiento previo del sistema o la aplicación de aproximaciones de prueba y error.

Otro procedimiento para minimizar los problemas de muestreo en espectros de orden 3 o superior, consiste en el muestreo radial de la dimensión temporal indirecta. Los datos que se obtienen poseen, por decirlo así, una dimensión reducida, pues son, en el caso de espectros 3D, las proyecciones 2D del espectro total. Para recuperar la información tridimensional a partir de los espectros 2D obtenidos mediante la aplicación de diferentes ángulos de proyección, es necesaria la aplicación de técnicas de retroproyección^{30,31} o de procedimientos de reconstrucción algebraica.³² La ventaja de esta aproximación consiste en que se puede emplear la transformada de Fourier para el procesamiento. Este tipo de *espectros de proyección-reconstrucción*, permiten una reducción muy importante del tiempo de adquisición, de varios órdenes de magnitud, particularmente en los espectros de dimensión superior o igual a 4. Por ello se han

²⁷ Hoch, J.C.; Stern, A.S. *Methods Enzymol.* **2001**, 338, 159-178.

²⁸ Rovnyak, D.; Filip, C.; Itin, B.; Stern, A.S.; Wagner, G.; Griffin, R.G.; Hoch, J.C. *J. Magn. Reson.* **2003**, 161, 43-55.

²⁹ Chen, J.H.; Nietlispach, D.; Shaka, J.A.; Mandelshtam, V.A. *J. Magn. Reson.* **2004**, 169, 215-224.

³⁰ Kupče, E.; Freeman, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 6429-6440.

³¹ Coggins, B.E.; Venters, R.A.; Zhou, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1000-1001.

³² Kim, S.; Szyperski, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1385-1393.

aplicado recientemente en estudios estructurales de proteínas basados en experimentos de correlación de dimensiones superiores a 5.³³

II.2.2.2 Muestreo selectivo (Espectroscopía de Hadamard)

En la espectroscopía de RMN tradicional todas las frecuencias se excitan simultáneamente mediante un pulso no selectivo. Es evidente que el barrido de todas las frecuencias, correspondientes o no a una señal en el espectro, resulta un procedimiento poco eficaz. La excitación selectiva de unas frecuencias determinadas cobra interés cuando se trata de un número reducido de frecuencias que contienen además, la información que interesa. La denominada *Espectroscopía de Hadamard* se basa en la excitación selectiva y simultánea de distintas frecuencias empleando una modulación de fase para cada una de ellas. Esto permite obtener la información separada de las distintas frecuencias.³⁴ Toda la información obtenida se codifica y descodifica de acuerdo con las denominadas matrices de Hadamard de tamaño $n \times n$. Durante la adquisición, las fases relativas de los pulsos selectivos a las distintas frecuencias se invierten de acuerdo con dicha matriz. El orden n de la matriz corresponde al número de frecuencias seleccionadas.

La espectroscopía de Hadamard supone un ahorro de tiempo siempre que el número de frecuencias n sea inferior al número de puntos que se muestrean a lo largo de la dimensión indirecta en la espectroscopía convencional. Se ha empleado con buenos resultados en la obtención de espectros multidimensionales de RMN de proteínas y ácidos nucleicos.^{35,36}

II.3. Secuencias de RMN ultrarrápidas (UF-NMR)

En el esquema de la RMN 2D tradicional, como hemos visto, el muestreo de los datos se realiza según el tiempo de adquisición t_2 de forma secuencial, de modo que cada paso corresponde a un valor diferente de t_1 . La secuencia se repite N_1 veces (figura II.16).

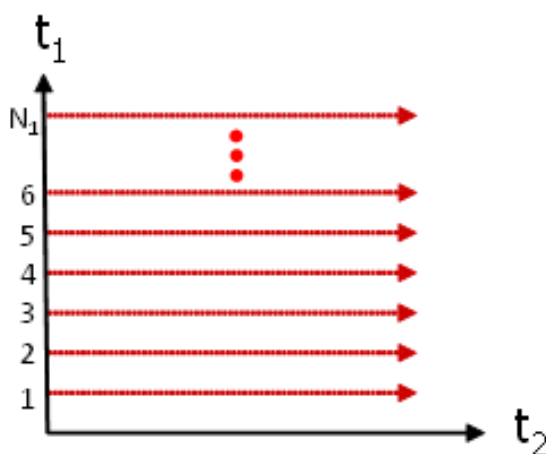


Figura II.16. Esquema de la adquisición de los datos en la RMN tradicional.

³³ Hiller, S.; Wasmer, C.; Wider, G.; Wüthrich, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10823-10828.

³⁴ Kupče, E.; Nishida, T.; Freeman, R. *Progress NMR Spec.* **2003**, *42*, 95-122.

³⁵ Lescop, E.; Rasia, R.; Brutscher, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5014-5015.

³⁶ Van Melckebeke, H.; Simorre, J.P.; Brutscher, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9584-9591.

En 2002 L. Frydman y colaboradores demostraron que es posible adquirir un espectro de RMN multidimensional en un único barrido³⁷. En esta nueva técnica, denominada espectroscopía de resonancia ultrarrápida (UF-NMR) el esquema de Jeener-Ernst de la RMN 2D/nD clásica se remplace por un esquema análogo pero en el que los pasos secuenciales se ejecutan en paralelo (figura II.17). En la UF-NMR los espines de la muestra son progresivamente excitados por N_1 pulsos de RF aplicados junto con gradientes de campo magnético, de modo que la muestra queda dividida en N_1 cortes espaciales. Estos elementos espaciales estarán *codificados espacialmente* mediante un valor de fase que corresponde a un valor de un parámetro temporal t_1 . El resultado es una hélice espacial para cada núcleo de la muestra. De hecho, cada corte en el que se ha dividido la muestra posee un *paso de la hélice* diferente. A la codificación espacial le sigue un periodo de mezcla estándar. Posteriormente, durante la adquisición, la codificación de los espines se deshace mediante el uso de gradientes de campo oscilantes capaces de leer las frecuencias codificadas espacialmente.

Debido a que el experimento de UF-NMR se realiza en un único barrido se produce una drástica reducción del tiempo de adquisición respecto a los experimentos de RMN nD tradicionales. Tal reducción permitiría la monitorización mediante espectros multidimensionales de procesos en tiempo real, experimentos que no podrían llevarse a cabo mediante la RMN nD clásica debido a los tiempos de realización de dichos experimentos.

En los capítulos siguientes se van a detallar los principios de la técnica de UF-NMR 2D NMR.

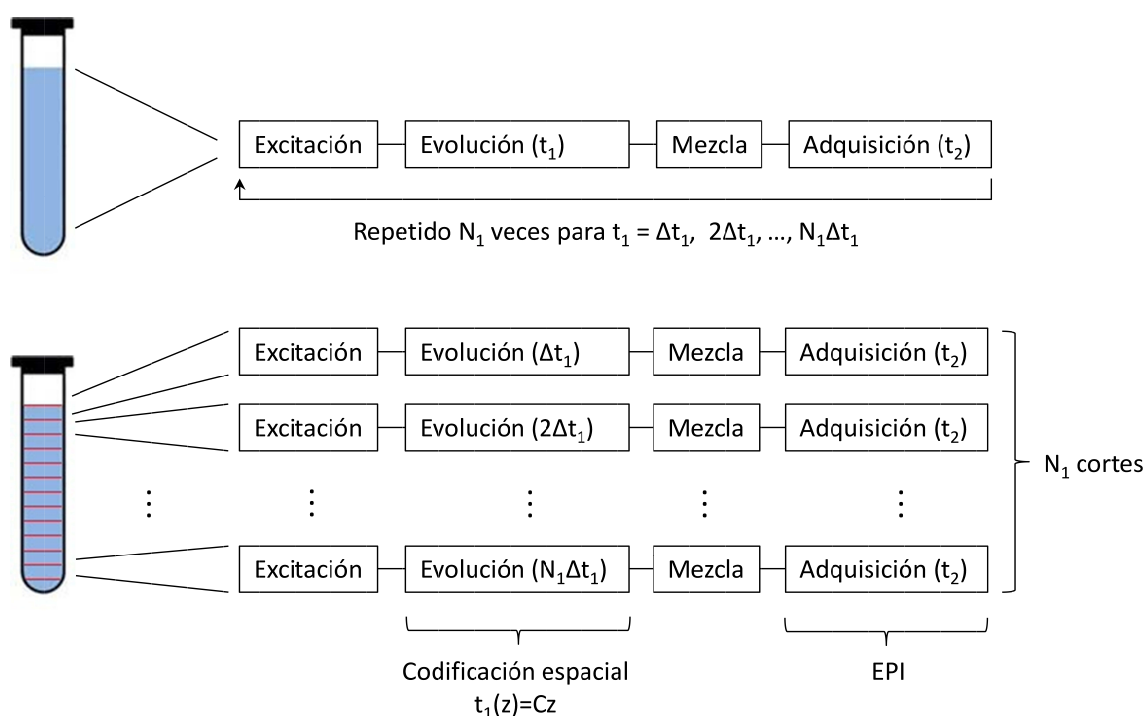


Figura II.17. Esquemas de la RMN tradicional (arriba) y de la UF-NMR (abajo). En el primer caso cada experimento 1D se repite N_1 veces con diferentes valores del tiempo de evolución t_1 . En el segundo caso los N_1 pasos de la codificación del tiempo t_1 se ejecutan en paralelo mediante una excitación espacialmente selectiva, generada mediante pulsos aplicados junto con gradientes. La descodificación espacial tiene lugar durante la adquisición haciendo uso de una secuencia EPSI, que a la vez codifica el tiempo de evolución t_2 .

³⁷ Frydman, L.; Scherf, T.; Lupulescu, A. *PNAS*. **2002**, 99 (25), 15858-15862.

II.3.1. Principios

Como se ha comentado la UF-NMR es la única técnica de RMN rápida que permite la adquisición de un experimento completo en un único barrido sin necesidad de un conocimiento previo de la muestra.

En la UF-NMR la muestra se divide en N_1 submuestras cada una de ellas caracterizada por un tiempo de evolución t_1 diferente. Para ello se aplica un gradiente de campo magnético, que generará una distribución de frecuencias en la muestra, junto con una secuencia de pulsos de RF selectivos equiespaciados temporalmente, cada uno de los cuales posee una frecuencia portadora correspondiente a cada una de los cortes en los que se ha dividido la muestra. Esta serie temporal generará una serie de tiempos de evolución t_1 (figura II.18).

Para que la señal obtenida tras la excitación espacial sólo refleje las frecuencias debidas al desplazamiento químico y al acoplamiento y no las frecuencias definidas por el gradiente, tras cada pulso de gradiente $+G_e$, se aplica un gradiente de signo opuesto y misma amplitud, $-G_e$ (figura II.18.). Si ambos gradientes se aplican durante el mismo intervalo de tiempo, se genera un eco de gradiente en el que cualquier desfase debido al gradiente de excitación $+G_e$ estará compensado por el gradiente inverso $-G_e$.

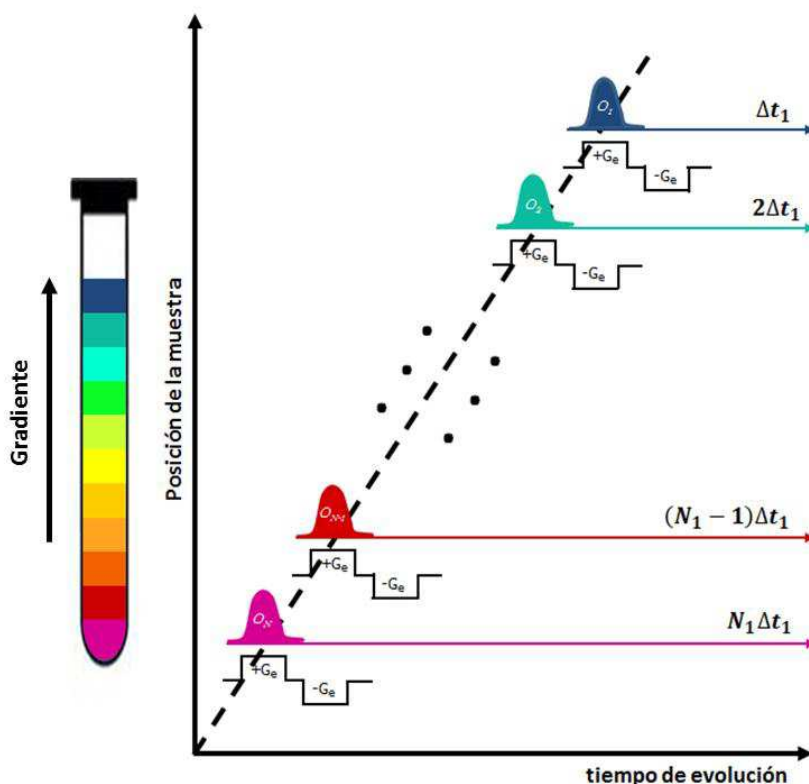


Figura II.18. Un tren de pulsos de RF de excitación equidistantes en tiempo y frecuencias se aplica en presencia de un gradiente de campo magnético para conseguir una evolución de los espines que se incrementa a lo largo de la muestra. Tras la excitación selectiva se aplica un gradiente de campo de signo inverso para eliminar la dependencia de la fase de señal con el gradiente de excitación.

A la codificación espacialmente selectiva le sigue un etapa de mezcla estándar de la secuencia 2D (COSY, HSQC, etc.) que afecta a todos los espines por igual y que no modifica la codificación generada en el paso anterior.

Para monitorizar las señales de cada uno de los cortes individuales habrá que llevar a cabo una detección espacial de la señal que además debe ser función del tiempo t_2 y producirse en un solo paso. Esta detección espacial/espectroscópica en un solo barrido puede realizarse mediante la técnica de imagen espectroscópica eco-planar (EPSI, Echo-planar Spectroscopic Imaging) desarrollada por Mansfield³⁸. Con ella, la señal de los espines se adquiere en presencia de un gradiente de campo magnético, que permite monitorizar la evolución obtenida durante el proceso de excitación selectiva. Este gradiente se alterna, $+G_a/-G_a$, durante la adquisición para codificar en función del tiempo de evolución t_2 (figura II.19 A).

La evolución en presencia de un gradiente G_a que oscila puede representarse mediante una trayectoria en zig-zag en el espacio $(k/\nu_1, t_2)$ ³⁹ (figura II.19 B).

En 2003 P. Pelupessy y colaboradores⁴⁰ propusieron el uso de pulsos de RF que modifican la frecuencia de forma lineal en lugar de los pulsos discretos. Estos pulsos se caracterizan por modificar su frecuencia con el tiempo lo que permite la codificación espacial de forma continua. En 2004 Frydman y colaboradores,⁴¹ basándose en la secuencia propuesta por Pelupessy, presentaron un nuevo esquema de excitación que emplea también pulsos continuos. En el primer caso la codificación se realiza mediante pulsos π de reenfoque adiabáticos, mientras que en el segundo se utilizan pulsos $\pi/2$ de excitación.

Estos esquemas de codificación espacial del dominio indirecto t_1 y sus elementos principales serán tratados en los siguientes apartados.

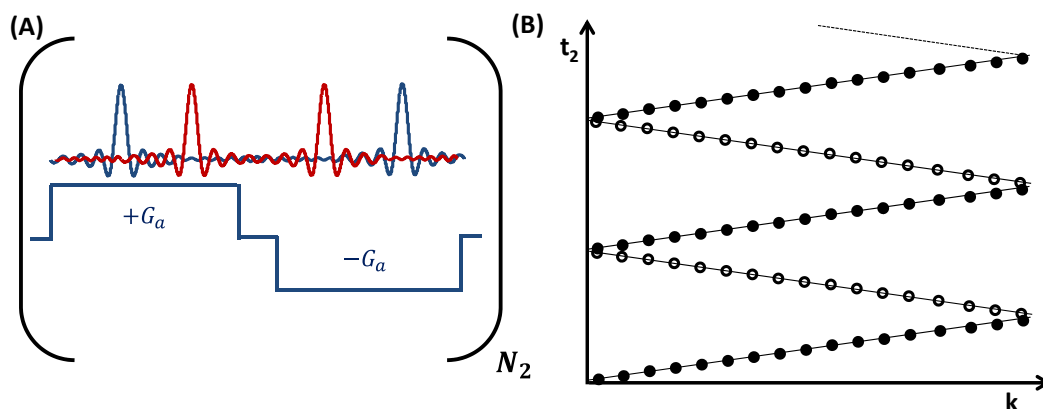


Figura II.19. (A) Representación esquemática de los gradientes $+G_a/-G_a$ aplicados durante la adquisición de la señal que permiten la monitorización de la frecuencia ν_1 y el tiempo t_2 . (B) Distribución de los datos adquiridos en función de las variables k/ν_1 y t_2 .

³⁸ Mansfield, P. *Magn. Reson. Med.* **1984**, *1*, 370-386.

³⁹ Se denomina *espacio-k* a la matriz de datos sin procesar, que se obtiene como resultado de las medidas de IRM, antes de aplicarle la transformada de Fourier para obtener la imagen.

⁴⁰ Pelupessy, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12345-12350.

⁴¹ Shrot, Y.; Shapira, B.; Frydman, L. *J. Magn. Res.* **2004**, *171*, 162-169.

II.3.2. Características generales

II.3.2.1. Gradientes de campo magnético

Quizás sea el desarrollo de gradientes de campo magnético la contribución más importante realizada en los últimos 30 años para el desarrollo de la RMN.

Los gradientes de campo magnético consisten en la variación controlada de la intensidad del campo magnético principal según una coordenada espacial y se generan mediante bobinas independientes a la que genera el campo magnético principal.

Los gradientes de campo tienen actualmente una extensa aplicación en RMN, tanto en IRM, para la que son imprescindibles, como en espectroscopía. Su utilización comenzó con los primeros pasos de la IRM, cuando Paul Lauterbur⁴² y Peter Mansfield⁴³ encontraron que cuando se establece un gradiente de campo magnético a lo largo de una dirección, a cada posición le corresponde una frecuencia de resonancia diferente.

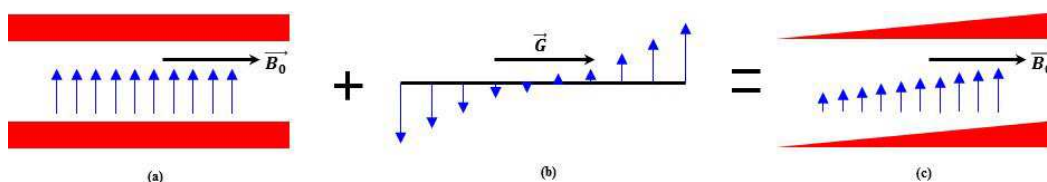


Figura II.20. (a) Representación de la intensidad de un campo magnético homogéneo; (b) Representación de un gradiente de campo magnético; (c) Representación del efecto de un gradiente de campo magnético sobre el campo magnético principal B_0 . Las flechas en todos los casos representan la intensidad del campo magnético principal, no su dirección.

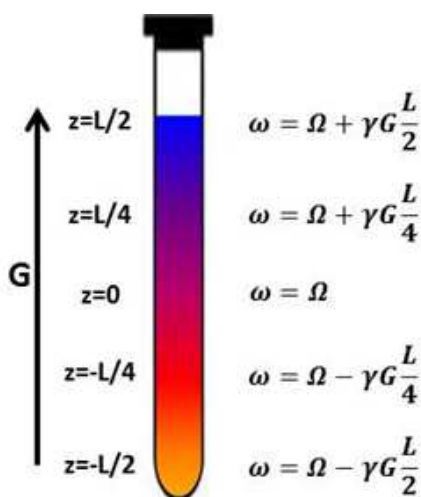


Figura II.21. Efecto de un gradiente de campo sobre una muestra: al aplicar el gradiente de campo la frecuencia de precesión de los espines se hace espacialmente dependiente de la forma $\omega_z + \Omega \gamma G_z z$. En la figura L es la longitud de la muestra.

⁴² Lauterbur, P. C. *Nature* **1973**, 242, 190-191.

⁴³ Mansfield, P.; Granell, P. K. *J. Phys. C* **1973**, 6, 422-426.

Por tanto, el propósito de un gradiente de campo magnético es alterar el entorno de los espines para que resuenen a diferentes frecuencias en diferentes posiciones de la muestra. Es decir, son el medio para obtener información espacial de los espines.

Formalmente, un gradiente de campo magnético es un campo adicional que se suma al principal \vec{B}_0 , con lo que el campo resultante se hace deliberadamente inhomogéneo (figura II.20). El resultado es que el campo magnético que actúa en cada punto de la muestra es diferente, por lo que la frecuencia de precesión, o frecuencia de Larmor, de cada núcleo dependerá de la posición que ocupa en la muestra. Es decir se genera una distribución espacial de frecuencias (figura II.21).

En un campo magnético homogéneo $\vec{B}_0 = B_0 \hat{z}$ y desde el punto de vista de la física clásica, los núcleos precesan alrededor de la dirección de dicho campo, \vec{B}_0 , a la frecuencia de Larmor, $\omega_L = \gamma B_0$, donde γ es la constante giromagnética del núcleo. Algunos espines precesarán con frecuencias ligeramente diferentes $\gamma(B_0 + \Delta B_0) = \omega_L + \Delta\omega$, donde $\Delta\omega = \gamma\Delta B_0$ es un término pequeño que depende del entorno químico de los espines definido por su desplazamiento químico, $\Delta\omega = \Omega$.

En el sistema de coordenadas rotatorio,⁴⁴ la frecuencia de resonancia de los espines viene dada por el desplazamiento químico, Ω . Cuando aplicamos un gradiente de campo, las frecuencias de resonancia variarán linealmente a lo largo de la muestra en la dirección del gradiente. Matemáticamente, estas variaciones de campo se describen mediante el vector \vec{G} , especificado en unidades de campo por unidad de longitud (p.e., Gauss por centímetro, mili Teslas por metro, etc). La frecuencia de precesión en el sistema de referencia rotatorio en presencia del campo magnético \vec{G} para un núcleo en particular en una posición determinada, vendrá dada por la superposición del desplazamiento químico Ω y un término dependiente del gradiente y de la posición de los espines (\vec{r}):

$$\omega(\vec{r}, t) = \Omega + \gamma \vec{G} \cdot \vec{r} \quad (1)$$

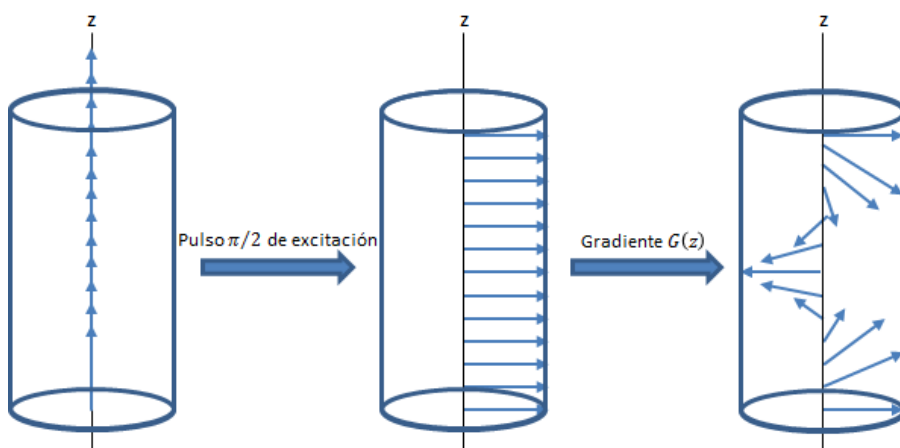


Figura II.22. Alineación inicial, excitación empleando un pulso $\pi/2$ y efecto producido por un gradiente, $G = G \cdot \hat{z}$. Los espines precesarán a velocidades diferentes formando una espiral a lo largo del eje z (en esta figura no se ha tenido en cuenta el efecto del desplazamiento químico).

⁴⁴ Es importante distinguir entre los dos sistemas de coordenadas usadas en RMN. El sistema de coordenadas cartesiano del espacio real, (x, y, z) , y el rotatorio del espacio de los espines, $(\hat{x}, \hat{y}, \hat{z})$. Estos sistemas de coordenadas se pueden considerar independiente uno del otro.

Tras un pulso de RF de excitación $\pi/2$, los espines, inicialmente en equilibrio térmico a lo largo del eje \hat{z} , son desplazados al plano $\hat{x}\hat{y}$. La presencia de un gradiente de campo hará que cada espín evolucione según la frecuencia dada por (1), lo que dará lugar a una espiral formada por los espines, ya que durante un intervalo de tiempo cada espín habrá precesado con una frecuencia diferente, dependiendo de su coordenada z (figura II.22). También se puede describir esta evolución como un desfase inducido en la señal total. Ya que el experimento de RMN/IRM monitoriza la suma total sobre todos los espines de la muestra, la señal de un conjunto de espines que están orientados según diferentes posiciones dará lugar a una resultante nula.

En la figura II.23 podemos observar el efecto de un gradiente de campo $+G$ que actúa sobre una conjunto de espines en el plano transversal y que es inmediatamente seguido por un gradiente aplicado durante el mismo tiempo pero de signo contrario, $-G$. Como hemos visto tras el primer gradiente la resultante de la señal sería nula, pero la señal se puede recuperar mediante la aplicación del segundo gradiente. La señal así generada se denomina eco de gradiente.

La fase adquirida debido al gradiente en el intervalo de tiempo $t' \in [t_1, t_2]$ viene definida por:

$$\Delta\phi_G(\vec{r}, t) = \vec{k}(t) \cdot \vec{r} \quad (2)$$

donde $\vec{k}(t) = \gamma \int_{t_1}^{t_2} \vec{G}(t') dt'$.⁴⁵ La señal adquirida en presencia de un gradiente puede expresarse como sigue:

$$s(t) \propto \int M_+(\vec{r}, t) d\vec{r} \propto \int \rho_0(\vec{r}) e^{i\vec{k} \cdot \vec{r}} d\vec{r} \quad (3)$$

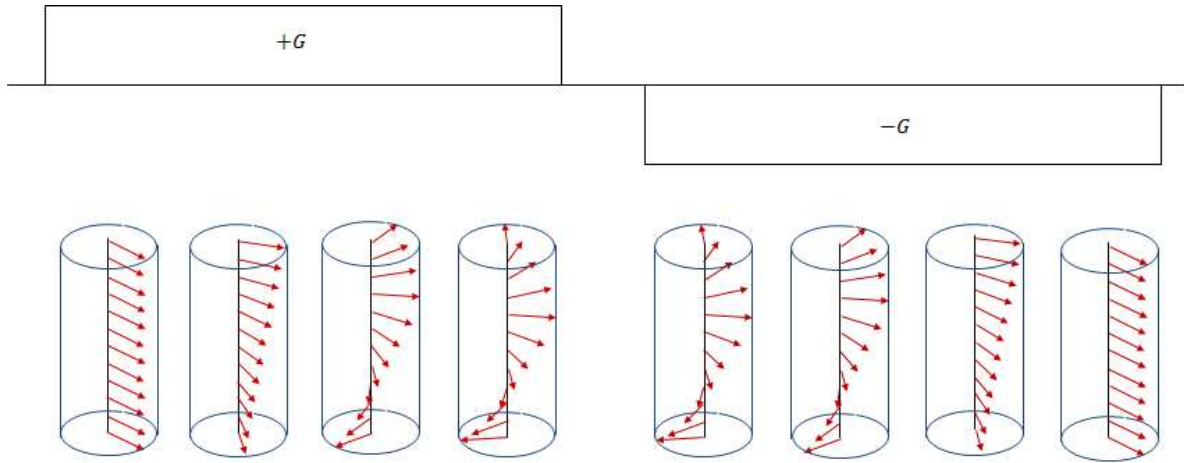


Figura II.23. Es posible reenfoque la hélice generada mediante un gradiente de campo $+G$ aplicando un segundo gradiente de igual intensidad y longitud, $-G$.

Como se puede observar las variables \vec{r} y \vec{k} son las variables conjugadas según una transformada de Fourier, de forma similar a la conjugación entre el tiempo y la frecuencia en los experimentos de RMN usuales. La ecuación (3) representa una

⁴⁵ \vec{k} y \vec{r} son variables conjugadas, es decir, \vec{k} representa las frecuencias espaciales. Sus unidades son por tanto de L^{-1} . Por ello, habitualmente se refiere a \vec{k} como el número de onda por similitud con el término empleado en óptica, en la que el número de onda es el inverso de la longitud de onda.

transformada de Fourier de la densidad de espines $\rho_0(\vec{r})$ sobre todo el volumen. Muestreando la variable $\vec{k}(t)$ sobre una matriz de datos, *espacio-k*, podremos reconstruir la densidad de espines $\rho_0(\vec{r})$. Esta observación está en el corazón de la IRM.

Todos los métodos de IRM basados en gradiente pueden ser vistos como diferentes formas de muestrear la señal de resonancia en el *espacio-k*.

En el esquema clásico de imagen el *espacio-k* se muestrea siguiendo trayectorias rectilíneas (figura II.24 a). Entre la adquisición de los datos de una trayectoria y la siguiente, es necesario dejar un tiempo de espera para que la magnetización recupere su valor inicial, antes de aplicar el siguiente pulso de excitación. Por tanto, el tiempo total de adquisición de la imagen será largo, debido a que los tiempos de recuperación de la magnetización longitudinal, T_1 , suelen ser del orden de unos pocos segundos.

En los últimos años se han desarrollado un gran número de técnicas encaminadas a acelerar este proceso de adquisición de la señal de la IRM, caracterizadas por sus diferentes formas de llenar este *espacio-k*. Entre todos estos métodos merece una atención especial el método de *Imagen Eco Planar* (EPI, por sus siglas en inglés Echo Planar Imaging) propuesto por P. Mansfield en 1977.⁴⁶

En este tipo de imagen el *espacio-k* se rellena de forma continua haciendo uso de una sola excitación. Existen varios modos de realizar esta adquisición, aunque las más comunes son las trayectorias que se muestran en las figuras II.24 b y II.24 c. Este tipo de adquisiciones se consigue haciendo oscilar muy rápidamente dos gradientes consecutivamente (figura II.24 b) o simultáneos (figura II.24 c).

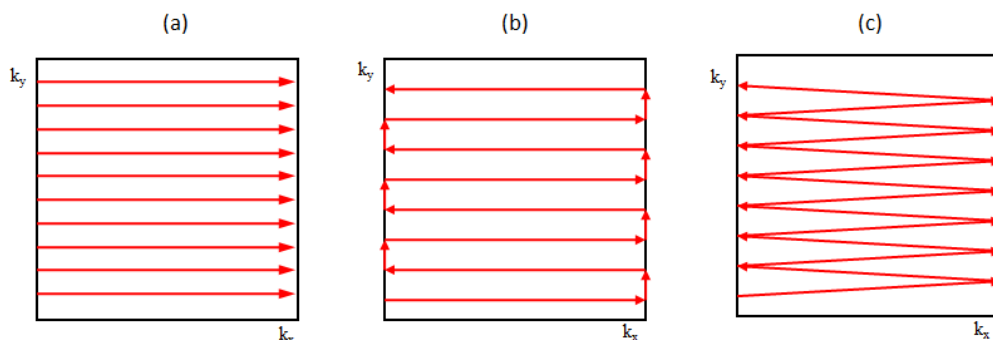


Figura II.24. Diferentes esquemas de rellenado del espacio-k de la IRM. (a) Esquema tradicional. (b) y (c) Esquemas de la imagen ecoplanar, EPI.

II.3.2.2. Codificación espacial

El corazón de la UF-NMR 2D es la codificación espacial, es decir, la partición física de la muestra en cortes con diferentes periodos de evolución. El objetivo es la creación de un tiempo de evolución t_1 dependiente de la posición de la forma $t_1(z) = Cz$.

Con este nuevo esquema al final de la codificación espacial, se habrá generado una espiral de magnetizaciones. Esta espiral, a diferencia del caso mostrado en la figura II.23, no se genera debido al efecto de un gradiente de campo magnético, sino que estará creada por los desplazamientos químicos de los espines.

Existen varias alternativas para generar dicha codificación espacial. En la figura II.25 se muestran tres de ellas.

⁴⁶ Mansfield, P.; Maudsley, A.A. *J. Magn. Reson.* **1977**, 27,101.

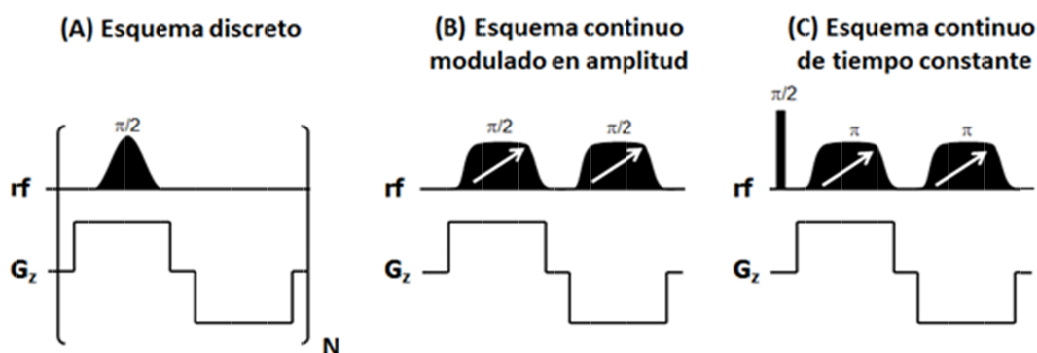


Figura II.25. Diferentes esquemas para la creación de un tiempo de evolución t_1 en cada corte. (A) Codificación discreta; (B) codificación continua modulada en amplitud; (C) codificación continua modulada de tiempo constante. Las flechas en cada pulso *chirp* indican el signo del ancho de banda, el cual determina la direccionalidad del barrido (de frecuencias negativas a positivas o viceversa).

En el *esquema discreto* (figura II.25 A) los espines de la muestra son progresivamente excitados mediante el uso de gradientes de campo que dividen la muestra en cortes, aplicados a la vez que un tren de pulsos de excitación selectivos secuenciales en el tiempo. En cada paso se incrementa la frecuencia portadora del pulso de RF, de modo que se excita un corte diferente de la muestra. Inmediatamente después de cada gradiente positivo, se aplica un gradiente negativo que cancela los efectos del gradiente positivo sobre la evolución de los espines. Al final, cada núcleo de la muestra dispondrá de una espiral de la magnetización diferente dependiendo de su frecuencia de evolución Ω_1 .

Este esquema tiene algunos inconvenientes. Es imposible excitar toda la muestra a menos que los pulsos tengan un perfil de excitación perfectamente cuadrado. Esto llevaría a una pérdida de señal que dependería del perfil de los pulsos empleados.

Los efectos de señales *fuera de resonancia*, en particular los desplazamientos de Bloch-Siegert,^{47,48} pueden afectar a las coherencias una vez que han sido excitadas, dando lugar a un desvío de la linealidad de la evolución del desplazamiento químico como función de la posición z .

Un tercer problema proviene de la selectividad de los pulsos de excitación. La duración de los gradientes de excitación debería ser lo suficientemente corta como para permitir una excitación selectiva. Esto no es un problema cuando se adquiere un espectro de ^1H -RMN, para el cual la dispersión en frecuencias de los espectros es pequeña, pero cuando se trabaja con otros núcleos, por ejemplo en ^{15}N -RMN, cuya dispersión en frecuencias es mucho mayor, es difícil conseguir crear una anchura espectral suficiente sin que exista solapamientos entre los pulsos.

Además del esquema discreto es posible conseguir la codificación espacial del dominio indirecto de modo continuo⁴⁹ mediante el uso de pulsos *chirp* de RF de barrido lineal.⁵⁰ Los dos esquemas alternativos al esquema anterior que se ha usado en el

⁴⁷ Emsley, L.; Bodenhausen, G. *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *168*, 297-303.

⁴⁸ Cuando se aplican pulsos de RF de alta potencia sobre alguna de las frecuencias de resonancia del espectro, se producen desplazamientos en las frecuencias de resonancias de las restantes señales del espectro, debido a que el pulso varía el campo magnético efectivo de los espines de la muestra.

⁴⁹ Shrot, Y.; Shapira, B.; Frudman, L. J. *Magn. Reson.* **2004**, *171*, 162-169.

⁵⁰ Böhlen, J.; Bodenhausen, G. J. *Magn. Reson. A.* **1993**, *102*, 293-301.

desarrollo de esta Tesis se muestran en la figura II.25 (B y C), aunque es posible conseguir este objetivo mediante otros esquemas.^{51,52,53,54}

Antes de analizar en detalle cada uno de estos esquemas veamos de qué modo los pulsos *chirp* generan la codificación espacial del dominio indirecto.

II.3.2.3. Pulsos *chirp* de excitación⁵⁵

Como hemos visto en el esquema de codificación espacial discreto, la codificación espacial del dominio indirecto se consigue mediante la excitación de cada corte de la muestra secuencialmente en el tiempo. Este mismo resultado podría obtenerse de forma continua mediante el uso de un pulso de barrido lineal, por ejemplo, un pulso *chirp*, en presencia de un gradiente de campo magnético, el cual excitaría los espines desde una posición $-L/2$ hasta la posición $+L/2$, siendo L la longitud de la muestra (figura II.21). Este es un elemento importante en la codificación espacial continua de las secuencias de UF-NMR.

A diferencia de los pulsos duros usuales en RMN, los cuales tienen una fase fija y una anchura definida por su duración, un pulso de RF *chirp* posee una frecuencia $\omega_{ch}(t)$, que es función del tiempo. En general un pulso de RF puede describirse como:

$$B(t) = B_1(t)[\cos(\phi_{ch}(t)) \hat{x} + \sin(\phi_{ch}(t)) \hat{y}] \quad (4)$$

donde $B_1(t)$ es la forma del pulso, que en el caso de un pulso *chirp*, es del tipo *WURST*,⁵⁶ y de una fase:

$$\phi_{ch}(t) = O_i t + \frac{Rt^2}{2} + \phi_0 \quad (5)$$

donde O_i es la frecuencia inicial del pulso y R es la velocidad del pulso *chirp*, es decir, la variación de la frecuencia por unidad de tiempo. Podemos definir $R = \Delta O / T_e$, donde T_e es la duración de pulso *chirp* e ΔO es la anchura de banda: $\Delta O = O_f - O_i$. Tomando la derivada frente al tiempo de la fase dada en la ecuación (5), se obtiene la frecuencia de un pulso *chirp*:

$$\omega_{ch}(t) = O_i + Rt \quad (6)$$

que como se aprecia varía linealmente con el tiempo. Esto permite que, aplicado junto a un gradiente de campo magnético, se puedan excitar los espines de forma lineal, que es lo que se pretende. Para ello se define $\Delta O = \gamma GL$ y $T_e = t_1^{max} / 2$.

En el instante t_z , el pulso *chirp* afectará sólo a aquellos espines con una frecuencia de resonancia igual a $\omega_{ch}(t_z)$ y los desplazará al plano $\hat{x}\hat{y}$.⁵⁷ Esto es, un pulso *chirp* lineal,

⁵¹ Andersen, N. S.; Kockenberger, W. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, 43, 795-797.

⁵² Shapira, B.; Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Magn. Reson.* **2006**, 178, 33-41.

⁵³ Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Chem., Phys.* **2006**, 125, 204507.

⁵⁴ Shrot, Y.; Tal, A.; Frydman, L. *Magn. Reson. Chem.* **2009**, 47, 415-422.

⁵⁵ El término *chirp* define el sonido agudo que emiten ciertos animales pequeños como los pájaros (gorjeo). En RMN los pulsos *chirp* se emplean en la excitación de anchos de banda que son aprox. 50 veces más anchos que el campo de RF.

⁵⁶ Kupce, E.; Freeman, R. *J. Magn. Reson. Ser. A.* **1995**, 115, 273-276.

que posee un barrido de frecuencia $\omega_{ch}(t)$ lineal, afectará secuencialmente a todas las frecuencias desde O_i a O_f .

Como ya se ha comentado un gradiente de campo que actúa a lo largo del eje z crea una correspondencia entre la posición y la frecuencia vía $\omega_e(r) = \Omega_1 + \gamma \vec{G} \cdot \vec{r} = \Omega_1 + \gamma G_e z$. Una excitación *chirp* lineal, que posee una frecuencia inicial O_i y una final O_f , aplicada junto con un gradiente de campo, excitará secuencialmente todos los espines desde $z_a = \omega_{ch}(0)/\gamma G_e$ a $z_b = \omega_{ch}(T_e)/\gamma G_e$.

Supongamos un gradiente de campo que genera una distribución de frecuencias en la muestra. Veamos que les ocurre a los espines en un corte z particular a lo largo de la duración del pulso *chirp* T_e . El conjunto de espines del corte, cuya frecuencia de resonancia es $\omega_e(z) = \Omega_1 + \gamma G_e z$, permanecerá sin ser afectado hasta el momento t_z , momento en el que la frecuencia instantánea del pulso *chirp*, $\omega_{ch}(t_z)$, coincide con la suya, $\omega_e(z)$. En este momento los espines son desplazados al plano $\hat{x}\hat{y}$. Durante el resto del pulso, $T_e - t_z$, continuarán precesando libremente hasta el final del pulso de RF, adquiriendo la fase adicional $\omega_{ch}(T_e - t_z)$.

Se puede demostrar⁵⁸ que la fase total $\phi_e(z)$ adquirida por los espines en la posición z sometidos a un pulso de excitación *chirp* de duración T_e y en presencia de un gradiente de campo G_e , viene dada por:

$$\Phi_e(z) = -\frac{(\gamma G_e)^2}{2R} z^2 + \gamma G_e \left(T_e + \frac{O_i - \Omega_1}{R} \right) z + \left(-\frac{(O_i - \Omega_1)^2}{R} + \Omega_1 T_e - \frac{\pi}{2} \right) \quad (7)$$

donde Ω_1 es el desplazamiento químico de los espines en esa posición; t_z el instante en el que la frecuencia del pulso *chirp* coincide con la frecuencia de resonancia de los espines en z y R la velocidad de variación de la frecuencia del pulso *chirp* ($R = (O_f - O_i)/T_e$). Como se puede observar, la fase $\phi_e(z)$ depende cuadráticamente con la posición z .

Un posible error podría recaer en la suposición de los efectos instantáneos atribuidos al barrido de la frecuencia de RF. Sin embargo, las simulaciones numéricas (y los experimentos) constatan la fiabilidad de esta aproximación.

Es posible demostrar⁵⁹ que el ángulo de rotación de un pulso *chirp* de excitación a potencias bajas es proporcional a \sqrt{R} . La simulación numérica permite calcular la constante de proporcionalidad necesaria para asegurarse un ángulo $\pi/2$. De este modo:

$$\gamma B_1 = 2\pi \times 0.27 \times \sqrt{R} \quad (8)$$

constituye una calibración de la potencia apropiada para una forma de pulso que no depende del tiempo.

⁵⁷ El ángulo de rotación será proporcional a la potencia del pulso *chirp* en ese instante. La fase $\phi_{ch}(t)$ del pulso de RF en el momento t_z servirá para determinar alrededor de qué eje girarán los espines con frecuencia de resonancia $\omega_{ch}(t_z)$.

⁵⁸ Tal, A.; Frydman, L. *Prog. Nuc. Mag. Res. Spect.* **2010**, 57, 241-292.

⁵⁹ Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Mag. Res.* **2005**, 172, 179-190.

II.3.2.4. Pulsos *chirp* de almacenamiento

Los pulsos *chirp* pueden utilizarse, no sólo para excitar los espines alineados en el eje \hat{z} al plano $\hat{x}\hat{y}$ con una fase cuadrática espacialmente dependiente, sino también para almacenar a lo largo del eje \hat{z} la magnetización con una fase lineal modulada en amplitud.

Veamos el efecto de un pulso $\vec{B}_1(t)$ *chirp* de almacenamiento de duración T_a , aplicado en presencia de un gradiente de campo G_a , con una frecuencia instantánea $\omega_{ch}(t) = \omega_i + Rt$. Como en el caso del pulso *chirp* de excitación asumiremos que el efecto del pulso sobre los espines es instantáneo, de modo que en el instante t_z sólo los espines en la posición z se verán afectados por el pulso de RF y que la potencia del pulso *chirp* ha sido adecuadamente calibrada para que los espines roten exactamente 90° y vuelvan al eje z . Esta vez, sin embargo, el pulso de RF sólo rotará aquella componente de los espines en el plano $\hat{x}\hat{y}$ que es perpendicular a él. Las componentes de la magnetización de los espines paralelas al pulso no serán almacenadas; estas componentes permanecerán en el plano $\hat{x}\hat{y}$ y podrán ser despreciadas.

Supongamos un espín en la posición z . Tras el pulso *chirp* de excitación el espín precesa en el plano $\hat{x}\hat{y}$ y posee una fase espacialmente dependiente. En el instante t_z el pulso de almacenamiento actúa sobre él. Este pulso actúa solamente sobre la componente de la magnetización perpendicular a él, que se desplazará hasta el eje z , donde quedará almacenada. La componente transversal de la magnetización continuará precesando y posteriormente se desfazará.

El efecto del pulso *chirp* es por tanto la superposición de tres efectos: añade una fase $\omega_a(z)t_z - \phi_{ch}(t_z)$ al espín, almacena la magnetización a lo largo del eje z y modula la amplitud mediante una nueva fase. La fase total acumulada será:⁶⁰

$$\omega_a(z)t_z - \phi_c(t_z) = \left(\frac{(\gamma G_a)^2}{2R}\right) z^2 + \left(-\frac{\gamma G_a(\omega_i - \Omega_1)}{R}\right) z + \left(\frac{(\omega_i - \Omega_1)^2}{2R}\right) \quad (9)$$

La calibración de la potencia del pulso *chirp* de almacenamiento es similar a la del pulso *chirp* de excitación.

II.3.2.5. Pulsos *chirp* de inversión

Los pulsos *chirp* pueden usarse además para invertir o desplazar los espines en el plano $\hat{x}\hat{y}$. Tales pulsos de RF pertenecen a la familia de los pulsos adiabáticos, conocidos por mantener el ángulo relativo entre la magnetización del espín y el campo magnético efectivo en un sistema de referencia apropiado.

Similar al pulso *chirp* $\pi/2$, un barrido *chirp* π rota los espines instantáneamente cuando su frecuencia de resonancia coincide con la frecuencia de precesión de los espines, pero el pulso *chirp* π conserva el ángulo relativo, θ , entre la magnetización de los espines y el campo magnético.^{61,62,63}

⁶⁰ Tal, A.; Frydman, L. *Prog. Nuc. Mag. Res. Spect.* **2010**, 57, 241-292.

⁶¹ Bohlen, J.M.; Burghardt, I.; Rey, M.; Bodenhausen, G. *J. Magn. Reson* (1969). **1990**, 90, 183-191.

⁶² Fu, R.; Bodenhausen, G. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, 245, 415-420.

⁶³ Tannús, A.; Garwood, M. *NMR Biomed.* **1997**, 10, 423-434.

El *teorema de adiabaticidad*⁶⁴ establece que, cuando la dirección del campo de RF varía más lentamente que la frecuencia de precesión de los espines, el ángulo entre el campo y los espines se conserva. Por ejemplo, en un estado donde los espines están inicialmente distribuidos en el plano $\hat{x}\hat{y}$, el plano rota conjuntamente con el campo de RF, de tal modo que el ángulo entre los espines y el campo se mantiene constante a lo largo del pulso, desplazando efectivamente los espines de nuevo al plano $\hat{x}\hat{y}$.

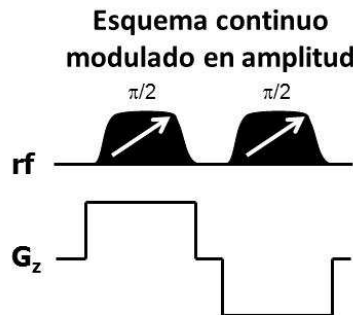
Asumiendo que un pulso de duración $T^{(\pi)}$ se aplica en presencia de un gradiente $G^{(\pi)}$, un espín con un desplazamiento químico Ω_1 y una posición z tendrá su frecuencia de resonancia dada por $\omega^{(\pi)}(z) = \Omega_1 + \gamma G^{(\pi)} z$. Un pulso de RF dotado con un barrido en frecuencia lineal rotará al espín sólo cuando ω_{ch} coincida con $\omega^{(\pi)}$ para ese valor de z . Esto ocurrirá en un instante t_z tal que $\omega_{ch}(t_z) = \omega^{(\pi)}(z)$. Un espín con una fase inicial ϕ_0 en una posición z , por tanto, precesará libremente hasta el instante t_z , y adquirirá una fase $\omega^{(\pi)} t_z$. En este momento, el pulso *chirp* rotará efectivamente con respecto a un eje colineal con el pulso de RF en el instante t_z . El vector magnetización continuará entonces precesando con una frecuencia $\omega^{(\pi)}(z)$ durante el resto de la duración del pulso $T^{(\pi)} - t_z$, y adquirirá una fase adicional $\omega^{(\pi)}(z)(T^{(\pi)} - t_z)$. La fase total del vector magnetización al final del pulso es por tanto:

$$\phi^{(\pi)}(z) = -\phi_0(z) - \left(\frac{(\gamma G^{(\pi)})^2}{R} \right) z^2 + \left(\frac{2\gamma G^{(\pi)}(\Omega_1 - \Omega_1)}{R} + \gamma G^{(\pi)} T^{(\pi)} \right) z + \left(T^{(\pi)} \Omega_1 - \frac{(\Omega_1 - \Omega_1)^2}{R} \right) \quad (10)$$

Debido a su naturaleza adiabática, la calibración de los pulsos *chirp* de 180° es un poco diferente a la descrita para los de 90° . La potencia de RF en kHz debe ser mayor que $\sqrt{R}/2\pi$. En la práctica, se encuentra que para el pulso de 180° el valor de γB_1 ha de ser 2.5 veces superior al valor necesario para el pulso de 90° (ecuación 8).

II.3.2.6. Codificación modulada en amplitud ($\pi/2 - \pi/2$)

Este método usa dos pulsos *chirp* de $\pi/2$ sucesivos para excitar y almacenar los espines. El objetivo del uso de ambos pulsos es además eliminar la dependencia con z^2 de la fase de la magnetización.



Supongamos espines en equilibrio térmico que son sometidos a un pulso *chirp* $\pi/2$ de duración $T^{(\pi/2)}$ y ancho de banda $\Delta\Omega^{(\pi/2)}$, en presencia de un gradiente $G^{(\pi/2)}$. Al final del pulso los espines habrán sido desplazados al plano $\hat{x}\hat{y}$ y habrán adquirido una fase

⁶⁴ Abraham, A. Principles of Nuclear Magnetism; Clarendon Press: Oxford, 1983.

definida por la ecuación (7). Esta fase contiene un término lineal en z , como es deseable, pero también un término cuadrático en z^2 . El segundo pulso *chirp* de $\pi/2$ almacena parte la magnetización a lo largo del eje z . Si ambos pulsos *chirp* poseen las mismas características (velocidad de barrido $R^{(\pi/2)}$ y duración $T^{(\pi/2)}$) pero son aplicados junto con gradientes de signo contrario, $G_e = -G_a \equiv G^{(\pi/2)}$, el resultado será que la magnetización almacenada sólo poseerá una fase dependiente de z :

$$\phi^{\frac{\pi}{2}-\frac{\pi}{2}}(z) = -\frac{2\gamma G^{(\pi/2)}T^{(\pi/2)}z}{\Delta O^{(\pi/2)}}\Omega_1 + T^{(\pi/2)}\Omega_1 - \frac{\pi}{2} \quad (11)$$

denominando

$$t_1(z) = -\frac{2\gamma G^{(\pi/2)}T^{(\pi/2)}}{\Delta O^{(\pi/2)}}z = \frac{2T^{(\pi/2)}}{L}z \equiv \frac{t_1^{max}}{L}z \quad (12)$$

donde $t_1^{max} = 2T^{(\pi/2)}$ es el tiempo total de codificación. La magnetización en el eje z puede definirse como $M_z(z) = M_0 \sin(t_1(z)\Omega_1 + A)$, siendo A una constante.

Mediante un pulso duro de $\pi/2$ la magnetización en el eje z es desplazada al plano $\hat{x}\hat{y}$. La magnetización transversal resultante será:

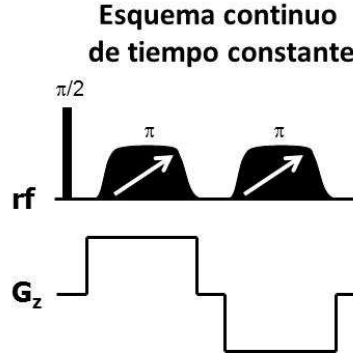
$$M_+(z) \propto \frac{1}{2i}e^{i(t_1(z)\Omega_1 + T^{(\pi/2)}\Omega_1 - \frac{\pi}{2})} + \frac{1}{2i}e^{-i(t_1(z)\Omega_1 + T^{(\pi/2)}\Omega_1 - \frac{\pi}{2})} \quad (13)$$

La magnetización que permanece en el plano transversal tras el pulso *chirp* de almacenamiento puede desfasarse mediante un gradiente G_a aplicado justo después del pulso *chirp* y anterior al tiempo de mezcla. La aplicación de un gradiente G_p durante un tiempo T_p antes de la adquisición, añade una fase adicional $\gamma G_p z T_p$ a ambas exponenciales. El efecto de dicha fase es desplazar el espectro en el dominio indirecto. Por tanto, aunque las dos señales en la ecuación (13) contribuyan a la FID, es posible desplazar una de ellas fuera de la anchura espectral mientras se observa la otra. Un efecto similar, pero con signo contrario, puede alcanzarse mediante un gradiente G_p aplicado de forma previa a la del pulso *chirp* de almacenamiento.

Las ecuaciones (11) y (13) demuestran que para cada experimento, caracterizado por la duración de los pulsos *chirp* y por la longitud de la muestra, el único parámetro que determina la hélice de los espines al final de la codificación espacial, es el desplazamiento químico, es decir, cada frecuencia posee una hélice de la magnetización asociada a ella.

II.3.2.7. Codificación de tiempo constante ($\pi - \pi$)

Un esquema alternativo para la codificación consiste en la excitación de los espines mediante un pulso duro $\pi/2$, seguido de dos pulsos *chirp* π con barridos idénticos pero aplicados junto a gradientes inversos.⁶⁵



El pulso duro de 90° desplaza los espines al plano $\hat{x}\hat{y}$. Tras el primer pulso π , la fase de los espines vendrá definida por la ecuación (10) en la que $\phi_0(z) = 0$. Al final del segundo pulso π la fase de los espines será:

$$\phi^{(\pi-\pi)}(z) = -\frac{4\gamma G^{(\pi)} T^{(\pi)} \Omega_1 z}{\Delta\omega} \quad (14)$$

que de nuevo da como resultado una fase lineal en z y dependiente de la frecuencia interna Ω_1 , como en el caso anterior. En este caso definimos:

$$t_1(z) = -\frac{4\gamma G^{(\pi)} T^{(\pi)}}{\Delta\omega} z = \frac{4T^{(\pi)}}{L} z = \frac{2t_1^{max}}{L} z \quad (15)$$

donde $t_1^{max} = 2T^{(\pi)}$, es el tiempo total de codificación.

II.3.2.8. Ventajas e inconvenientes de cada método

Aunque los dos métodos consiguen la codificación de t_1 como función de la posición cada uno posee sus ventajas y sus desventajas.

La respuesta en frecuencia de la codificación modulada en amplitud es mejor que la del método de codificación de tiempo constante, que emplea pulsos π . Los pulsos $\pi/2$ son más fáciles de optimizar debido a que la respuesta de los pulsos de excitación y almacenamiento es lineal. Por otro lado este método posee algunas desventajas:

- Este método no es adecuado para aquellas secuencias cuyos tiempos de mezcla requieren que los espines permanezcan en el plano $\hat{x}\hat{y}$ como ocurre en la secuencia COSY o J-resuelta.
- La intensidad de la señal es la mitad debido a que sólo se observa uno de los términos de la ecuación (13).

⁶⁵ Pelupessy, P. J. *Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12345-12350.

- Los pulsos $\pi/2$ son más sensibles a las inhomogeneidades de RF que los pulsos π .

El tiempo $t_1(z)$ que permanecen los espines en el plano transversal varía entre los diferentes métodos. Los tiempos elevados, aunque pueden aumentar la pérdida de intensidad debida a la relajación transversal, permiten una resolución más fina en el dominio indirecto, del mismo modo que ocurre en la espectroscopía 2D tradicional. Para una coordenada z dada, el método de tiempo constante será ventajoso frente al método modulado en amplitud.

La utilización de gradientes de campo constantes intensos y/o de larga duración, puede dar lugar a pérdidas de intensidad de la señal debidas a la difusión. Gradientes cortos alternos pueden reducir este efecto por lo que el método discreto original (figura II.25 a) será ventajoso respecto a los métodos continuos (figuras II.25 b y II.25 c).

II.3.2.9. Decodificación de la señal

En la espectroscopía de RMN las señales se adquieren como función de variables temporales y el espectro se obtiene mediante la transformada de Fourier de los datos adquiridos. En el caso de los espectros de UF-NMR, en los que la muestra ha sido dividida en elementos espaciales, cada uno con un tiempo de evolución diferente, necesitaríamos adquirir el espectro para cada uno de estos elementos y discriminarlos, es decir, obtener espectros en función de la posición. La forma más sencilla para realizar esta adquisición espacial-espectral es mediante la aplicación de la secuencia EPSI (Echo Planar Spectroscopy Imaging),⁶⁶ que se muestra en la figura II.26.

Los gradientes permiten obtener la distribución de los espines según su posición, mientras que la alternancia reenfoca el efecto de los gradientes, permitiendo que tenga lugar la evolución del desplazamiento químico y modulando la señal según la variable t_2 . Por tanto, la señal total resultante tiene codificada las interacciones dependientes de la posición y del desplazamiento químico.

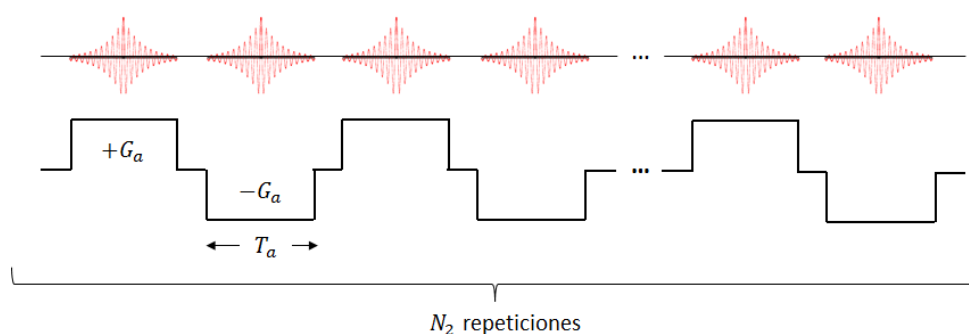


Figura II.26. Secuencia EPSI usada para adquirir una FID (o espectro) por cada posición. En esta secuencia los datos se adquieren en presencia de gradientes alternantes.

Consideremos el estado de un conjunto de espines con desplazamiento químico Ω_1 que han sido codificados espacialmente mediante alguno de los esquemas mostrados en la figura II.25 justo antes de la adquisición. En este momento los espines se encontrarán en el plano $\hat{x}\hat{y}$ y poseerán una fase de la forma $M_+(z) = M_0 e^{it_1(z)\Omega_1}$ dependiente de la posición, donde M_0 es una constante de proporcionalidad y $t_1(z) = Cz$ y C depende del

⁶⁶ Frydman, L.; Lupulescu, A.; Scherf, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9204-9217.

método de codificación. Al final del proceso de codificación espacial los espines pueden ser vistos como una hélice a lo largo del eje z en la que el grado de torsión no está determinado por ningún gradiente externo sino por el coeficiente $C\Omega_1$. *Cuanto mayor es el desplazamiento químico mayor será el grado de torsión de la hélice.* Como ocurre en el caso de una espiral derivada de un gradiente, adquirir la señal en este estado sólo producirá ruido, ya que la señal es la suma vectorial de las señales procedentes de todos los espines de la muestra y los espines en diferentes zonas de la muestra se encuentran dirigidos hacia a diferentes puntos del plano $\hat{x}\hat{y}$, de modo que se cancelan al sumarse vectorialmente. Sin embargo, si se aplica un gradiente durante la adquisición de la señal es posible deshacer la hélice y alinear los espines de modo que se forme un eco. Si el gradiente continúa aplicado volverá a formarse la hélice de modo que la señal decaerá de nuevo.

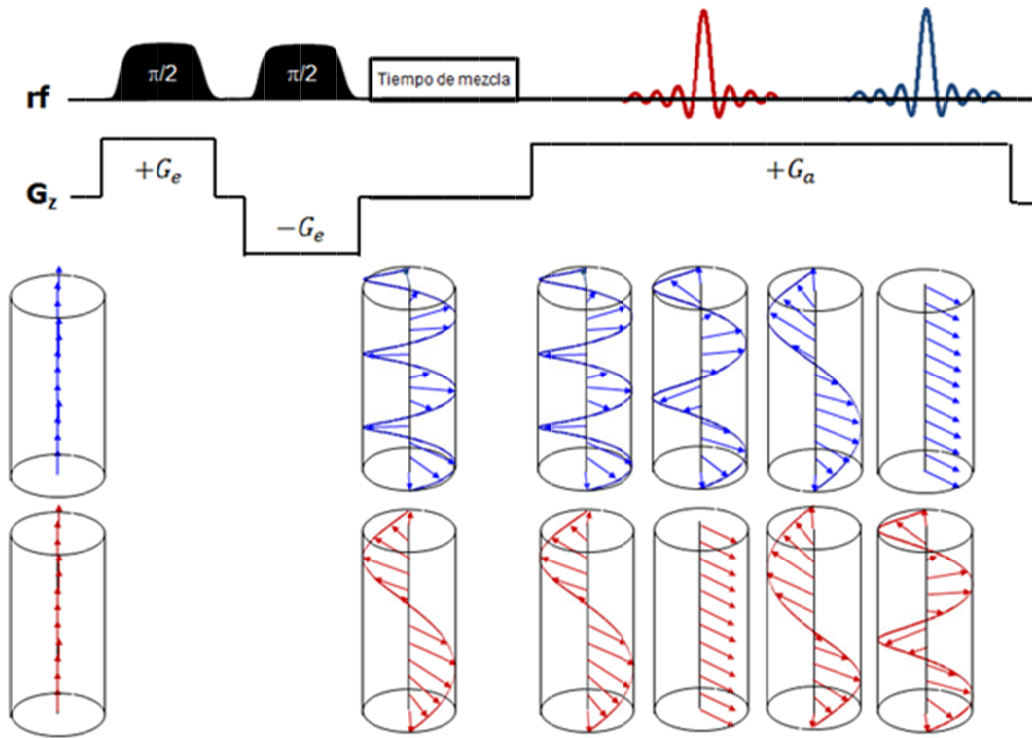


Figura II.27. Adquisición en presencia de un gradiente para una muestra que contiene núcleos con dos desplazamientos químicos, $\Omega_1^{(1)}$ y $\Omega_1^{(2)}$. Durante la codificación espacial los espines son desplazados al plano $\hat{x}\hat{y}$ y se forman a lo largo del eje z , hélices cuyo paso es proporcional a sus respectivos desplazamientos químicos. Una vez codificada, se aplica la etapa de mezcla, durante la cual se conservan las fases relativas y por tanto la torsión. En ese momento se aplica un gradiente a la vez que se adquiere la señal. Según se deshacen las hélices se forman los ecos. Cada desplazamiento químico forma un eco en el momento en que $t^{(j)} = -(C/\gamma G_a)\Omega_1^{(j)}$, cuando los espines asociados a él se alinean. La señal resultante es la superposición de las señales procedentes de los diferentes desplazamientos químicos.

La figura II.27 muestra el proceso para dos núcleos no equivalentes químicamente. Durante la adquisición en presencia de un gradiente G_a la fase de los espines evolucionará como:

$$\phi_a(t) = C\Omega_1 z + \gamma G_a t z = (C\Omega_1 + \gamma G_a t) z \quad (16)$$

Los espines se alinearán cuando $C\Omega_1 + \gamma G_a t = 0$, esto es cuando

$$t_{eco} = -\frac{c}{\gamma G_a} \Omega_1 \quad (17)$$

La señal correspondiente a núcleos con diferentes desplazamientos químicos será la superposición de las señales correspondientes a los desplazamientos químicos individuales. Una muestra que contenga n desplazamientos químicos diferentes, $\Omega_1^{(1)}, \Omega_1^{(2)}, \dots, \Omega_1^{(n)}$, formarán n ecos en las posiciones $t_{eco}^{(j)} = -C \Omega_1^{(j)} / \gamma G_a$. Ya que la posición es proporcional a Ω_1 , el patrón de ecos adquirido será de hecho proporcional al espectro a lo largo del dominio indirecto.

Como se puede observar, el gradiente reenfoca la hélice de espines y crea un eco, actuando como una transformada de Fourier continua, que sustituye a la transformada de Fourier numérica habitual en la RMN tradicional.

Este modo de obtener la información espectral de RMN mediante un gradiente, abre la posibilidad de adquirir un espectro 2D de RMN completo en un solo *scan*, mediante la inversión del gradiente de adquisición. La acción del gradiente es reversible. Las hélices pueden formarse de nuevo mediante un gradiente negativo $-G_a$ aplicado tras el gradiente positivo G_a , con idéntica intensidad y duración. El efecto de este gradiente negativo es invertir cualquier “enrollamiento” que se haya inducido durante la aplicación del gradiente positivo. La fase $\gamma G_a T_a z$ añadida durante el gradiente positivo se cancela con la fase que se añade durante el gradiente negativo $-\gamma G_a T_a z$. La señal adquirida durante el gradiente negativo formará de nuevo ecos pero en orden inverso, dando lugar a un patrón de ecos que son la imagen especular del adquirido en presencia del gradiente positivo. (figura II.28 a).

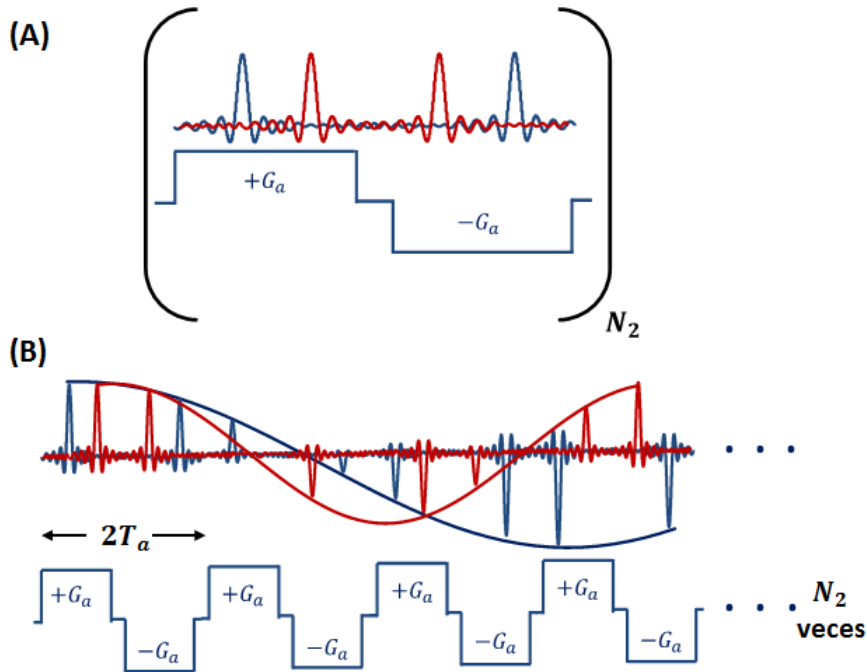


Figura II.28: Adquisición del espectro UF-NMR 2D en un solo barrido. (A): mediante la inversión del gradiente de adquisición es posible reenfocar de nuevo las hélices de los espines formados durante el proceso de codificación espacial y formar otra vez el patrón de ecos, aunque en sentido inverso respecto al formado durante el gradiente positivo; (B) repitiendo el gradiente bipolar, $+G_a/-G_a$, N_2 veces, es posible monitorizar la evolución Ω_2 de los espines. De este modo se adquiere el espectro 2D en un solo *scan*.

Junto con el proceso de reenfoque-desenfoque, los espines precesan de acuerdo con sus inherentes desplazamientos químicos Ω_2 . Por tanto los ecos procedentes de cada desplazamiento químico estarán además modulados por el término $e^{it_2\Omega_2}$, que representa su evolución según el desplazamiento químico del dominio directo Ω_2 (figura II.28 b). Por tanto, adquiriendo los datos codificados espacialmente en presencia de un gradiente, podemos observar el dominio indirecto. Mediante la aplicación de un gradiente oscilante se modulan los ecos del dominio indirecto según la evolución a lo largo del dominio directo. Esto es, se barre el plano $(\Omega_1 - t_2)$ y por tanto se puede adquirir el espectro 2D, en un único *scan*.

El gradiente de adquisición actúa como una transformada de Fourier analógica en la dirección indirecta t_1 , por lo que para obtener el espectro de RMN a partir de los datos adquiridos mediante los gradientes oscilantes, $S(k/\nu_1, t_2)$, sólo es necesario realizar la transformada de Fourier numérica respecto a la dirección directa t_2 . Para ello es necesario reordenar los datos, que se adquieren como una serie 1D de datos de RMN, de modo que cada columna k/ν_1 se ordena en una matriz bidimensional (figura II.29). Los datos así ordenados no están equiespaciados, como es necesario para la realización de la transformada de Fourier, por lo que la matriz debe dividirse en dos matrices, una procedente de los datos adquiridos durante el gradiente positivo y otra procedente de los datos adquiridos durante el gradiente negativo (figura II.29). De este modo es posible realizar la transformada de Fourier a lo largo de la dirección t_2 obteniendo dos espectros $I(\Omega_1, \Omega_2)$. Ambos espectros podrán ser combinados posteriormente para aumentar la relación S/R del espectro final (figura II.29).

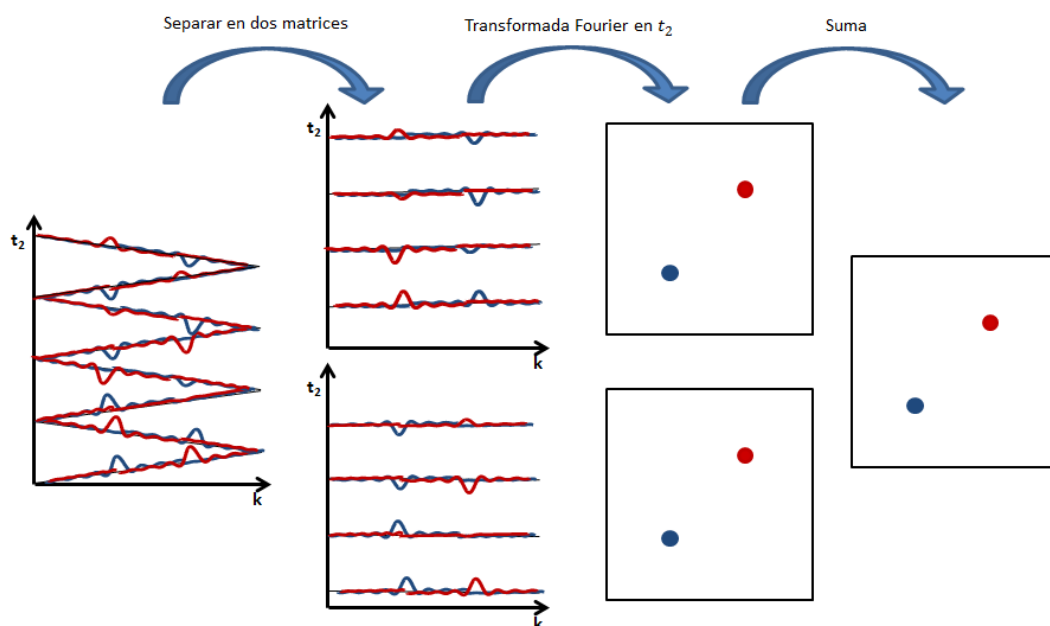


Figura II.29: Procesado de los datos de UF-NMR 2D: una vez ordenados los datos en una matriz 2D, los datos procedentes de los gradientes positivos y los procedentes de los gradientes negativos se separan en dos matrices. Cada conjunto de datos se transforman mediante la transformada de Fourier a lo largo del eje t_2 con un tiempo de muestreo igual a $2T_a$. Los espectros resultantes pueden sumarse para aumentar la señal total.

II.3.3. Aspectos experimentales

II.3.3.1. Características espectrales

En el experimento UF-NMR 2D los datos no son adquiridos en el plano $(t_1 - t_2)$ sino en el plano $(k/v_1 - t_2)$.

Los datos a lo largo del eje t_2 son muestreados del mismo modo que en La RMN convencional, por lo que la anchura espectral y la resolución son similares. La anchura espectral será igual al inverso del tiempo de muestreo, que en este caso es $2T_a$, es decir, $SW_2 = 1/2T_a$. La resolución estará definida por el tiempo de adquisición máximo en esta dirección y que es igual a $2N_2T_a$, donde N_2 es el número de repeticiones de los gradientes. Por tanto, la resolución a lo largo de t_2 tras la transformada de Fourier es $\Delta v_2 = 1/2N_2T_a$.

El cálculo de los parámetros del dominio indirecto es algo diferente. El eje k es proporcional al eje de las frecuencias en el dominio indirecto a través del coeficiente espacio-temporal $C = t_1^{max}/L$, donde $t_1^{max} = 2T_e$ y T_e es la duración de cada pulso *chirp* y L es la longitud de la muestra. Por otro lado, el rango de k que se reenfoca durante el proceso de adquisición vendrá determinado por la duración e intensidad del gradiente durante dicha adquisición: $k_{max} = \gamma G_a T_a$. Esto da lugar a una anchura espectral del dominio indirecto que es $SW_1 = |k_{max}/C|$. La resolución corresponderá a la menor diferencia en los valores de k que el gradiente de adquisición puede resolver.

Los valores de la intensidad y el tiempo de aplicación de los gradientes de codificación espacial y de adquisición, anchura espectral de los pulsos adiabáticos, etc. se eligen en función de la anchura espectral deseada en el dominio directo e indirecto. Por ejemplo las anchuras espectrales para el caso de la codificación modulada en amplitud son:

$$SW_1 = |(R\gamma_a G_a T_a)/(2\gamma_e G_e)|$$

$$SW_2 = 1/(2T_a)$$

Donde, T_a es la duración del gradiente de adquisición; G_a la intensidad de dicho gradiente; G_e la intensidad del gradiente de excitación; γ_a y γ_e las constantes giromagnéticas de los núcleos involucrados en la adquisición y la excitación, respectivamente, que sólo serán diferentes en el caso de experimentos heteronucleares; y R es, como hemos visto en apartados anteriores, la velocidad de variación del *offset* del pulso *chirp*.

Para otros métodos se obtienen las relaciones entre las anchuras espectrales y la resolución con los parámetros experimentales. Estas relaciones se muestran en la [tabla II.1](#).

	SW_1	Δv_1	SW_2	Δv_2
Codificación continua modulada en amplitud	$\frac{\gamma_a G_a T_a L}{t_1^{max}}$	$\frac{1}{t_1^{max}}$	$\frac{1}{2T_a}$	$\frac{1}{2T_a N_2}$
Codificación continua de tiempo constante	$\frac{\gamma_a G_a T_a L}{2t_1^{max}}$	$\frac{1}{2t_1^{max}}$	$\frac{1}{2T_a}$	$\frac{1}{2T_a N_2}$
Codificación continua modulada en fase ⁶⁷	SW_1	$\frac{1}{T^{\pi/2} - T^{\pi}}$	$\frac{1}{2T_a}$	$\frac{1}{2T_a N_2}$

Tabla II.1. Valores de la anchura espectral y la resolución de los dominios directo e indirecto para tres esquemas de codificación espacial.

II.3.3.2. Codificación espacial

La discusión en los apartados anteriores supone una codificación espacial ideal, es decir, espines con una fase $C\Omega_1 z$ justo antes de la adquisición. En la práctica pueden aparecer también otros términos. La forma más general de la fase resultante de la codificación espacial será:

$$\phi_e(z) = C\Omega_1 z + bz + a_1\Omega_1 + a_0 \quad (18)$$

Donde b , a_1 y a_0 son conocidos⁶⁸ e independientes de Ω_1 y z .

El término a_0 es constante y afecta a todas las señales del espectro de la misma forma. Puede compensarse usando un método convencional de ajuste de la fase de orden cero.

El término lineal bz , compartido igualmente por todos los desplazamientos químicos, desplazará uniformemente los ecos adquiridos a lo largo del eje k . Significa una torsión adicional de los espines a lo largo del eje z y se comporta como un desplazamiento en frecuencia del dominio indirecto. Ya que la dependencia exacta de b con los parámetros experimentales es conocida, es posible eliminarlo completamente aplicando un gradiente de purga, G_p , durante un tiempo T_p antes de la adquisición, de modo que $\gamma G_p T_p = -b$. El gradiente de purga previa a la adquisición puede usarse también para desplazar los ecos en el dominio indirecto en una cantidad $\Delta k = \gamma G_p T_p$. Por ejemplo, en el esquema modulado en amplitud puede darse el caso de ecos que aparecen en valores negativos de k y que no se observarían. Mediante el gradiente de purga desplazamos el origen de k de modo que nos aseguramos que todo el espectro se observa en la ventana $k \in [0, k_{max}] \equiv [0, \gamma G_a T_a]$. La calibración precisa de este desplazamiento incluye la elección del punto adecuado de la secuencia en el que insertar G_p y puede necesitar un ajuste fino mediante la realización de un experimento de prueba. Además, La purga previa a la adquisición es normalmente un requisito esencial para eliminar artefactos axiales y también para la selección de la coherencia

Otros dos parámetros concernientes al proceso de la codificación espacial que merecen mención son el gradiente de excitación G_e y el ancho de banda del pulso chirp $\Delta\omega$. En presencia de un gradiente de campo G_e , los espines que poseen un desplazamiento químico Ω_1 abarcarán un rango de frecuencias que comprende desde

⁶⁷ Tal, A.; Shapira, B; Frydman, L. *J. Magn. Reson.* **2005**, 176, 107-114.

⁶⁸ Tal, A.; Frydman, L. *Prog. Nuc. Mag. Res. Spect.* **2010**, 57, 241-292.

$\Omega_1 - (\gamma G_e L/2)$ a $\Omega_1 + (\gamma G_e L/2)$, donde L es el tamaño físico de la muestra (ver figura II.30). La muestra contiene muchos espines con desplazamientos químicos diferentes y es imposible configurar anchuras de banda $\Delta\omega$ para conseguir excitarlos a todos perfectamente. Habrá siempre regiones de frecuencia que no son irradiadas (dando lugar a una excitación parcial de los espines y disminuyendo por tanto la intensidad de la señal), o regiones de frecuencia que son irradiadas pero no contienen espines (dando lugar a $t_1(z)$ inhomogeneos según la posición). Estas regiones pueden minimizarse, disponiendo de una anchura de banda $\Delta\omega = \gamma G_e L \gg SW_1$, siendo SW_1 la anchura espectral en el dominio indirecto, Un valor típico de SW_1 para protón es 5 kHz y para una muestra estándar de 20 mm, sugiere un valor mínimo de 10 G/cm para G_e . Aumentar G_e por encima de este valor sólo serviría para introducir pérdidas y distorsiones debido a la difusión molecular.^{69,70}

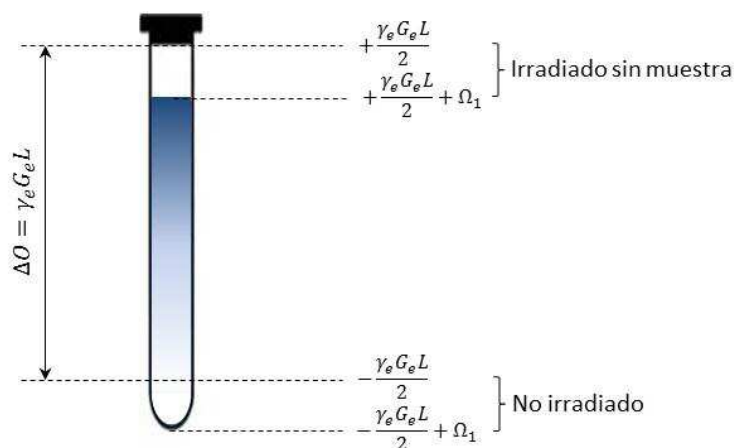


Figura II.30: En la práctica la anchura del pulso *chirp* se selecciona para que abarque la longitud de la muestra completa.

II.3.3.3. Forma de línea

Los espectros 2D de UF-NMR muestran una evidente asimetría. Así, el eje espectral indirecto k/v_1 está monitorizado a través de los gradientes, que dan lugar a la formación de los ecos, mientras que en el eje espectral directo se observa la modulación del desplazamiento químico de estos ecos, con un tiempo de muestreo efectivo de $2T_a$ y un tiempo total de adquisición de $2N_2T_a$. Como resultado, el dominio directo muestra todos los rasgos característicos del espectro de RMN de transformada de Fourier, en términos de anchura espectral (SW_2), de resolución ($\Delta\nu_2$) y del *offset* de la ventana espectral. La novedad del dominio indirecto codificado espacialmente merece un análisis más profundo.

La fase tras la codificación espacial tiene la forma de la ecuación 18. Como hemos visto en la sección anterior, no hay pérdida de generalidad al suponer que $a_0 = b = 0$, pero a_1 sí tiene que ser tenida en cuenta, dando lugar a la forma general de los ecos:

$$S(k, t_2) \propto LM_0 e^{it_2\Omega_2} \left[\text{sinc} \left(\frac{(c\Omega_1 + k(t_2))L}{2} \right) e^{ia_1\Omega_1} \right] \quad (19)$$

⁶⁹ Giraudeau, P; Akoka, S. J. *Magn. Res.* **2008**, 192, 151-158.

⁷⁰ Shrot, Y.; Frydman, L. J. *Chem. Phys.* **2008**, 128(5), 052209/1-052209/14.

Por tanto a_1 se comporta como una distorsión de fase de primer orden a lo largo del dominio indirecto. Aunque se conoce a priori, corregir esta clase de distorsiones puede ser complicado.

Otro efecto que debe tenerse en cuenta es la relajación T_2 , que da lugar a formas de líneas que poseen una componente dispersiva, es decir, las dos partes, real e imaginaria, del espectro están entrelazadas. Las señales resultantes, exhiben un fenómeno conocido como *phase twisting*. Se puede utilizar el espectro en modo magnitud $I(\nu_1, \nu_2)$, pero esto da lugar a una pérdida de resolución y puede conducir a la cancelación de señales.

Mediante manipulaciones adecuadas pueden muestrearse también los valores negativos de t_1 , por ejemplo, adquiriendo los conjuntos 2D eco/anti-eco.

Otra solución la ofrece la adquisición de tiempo constante. En este esquema los efectos de la relajación del dominio indirecto producen pérdidas uniformes de la señal independientes de t_1 . Aunque este esquema lleva asociada una pérdida de S/R, evita la modulación y por tanto las componentes dispersivas a lo largo de ν_1 .

Una opción diferente se basa en el hecho de que, cuando se almacena la magnetización de los espines, se guardan dos imágenes especulares de la distribución de los espines, similar a las distribuciones eco-antieco mencionadas anteriormente. Una de las imágenes puede observarse monitorizando los valores positivos de k , mientras que para la otra hay que recurrir a los valores negativos de k . Esto puede lograrse mediante dos experimentos independientes con los gradientes invertidos. Alternativamente, pueden monitorizarse en un solo experimento, aunque a expensas de desplazar todo el patrón de ecos y de duplicar el rango k_{max} . Independientemente del camino, cada conjunto de datos resultante tendrá componentes dispersivas a lo largo del eje k , iguales en magnitud pero de signo contrario. Sumándolas nos aseguramos que los ecos en el dominio indirecto estén puramente en absorción.

Otras opciones, que no presentan analogías en la RMN 2D convencional, surgen en los experimentos codificados espacialmente. Estos incluyen, por ejemplo, el uso de esquemas de codificación simétricos.⁷¹

II.3.3.4. Relación señal/ruido (S/R)

El hecho de que toda la información de $I(\nu_1, \nu_2)$ pueda adquirirse en un solo barrido no significa que dicha aceleración sea posible, pues solamente cuando la relación S/R sea suficientemente alta podrá llevarse a cabo. De todas formas, si la relación S/R es adecuada, se pueden promediar varios *scans* del mismo modo que se hace en la RMN 1D.

La relación S/R de un experimento 1D de RMN convencional es igual a:

$$S/R_{1D} = \frac{\sqrt{N}LM_0}{\hat{n}_{rms}} = \frac{\sqrt{N}LM_0}{n_{rms}} \quad (20)$$

donde N es el número de puntos adquiridos, L es la longitud de la muestra, M_0 la magnetización por unidad de longitud y n_{rms} la raíz cuadrática media del ruido muestreado en el tiempo.

⁷¹ Shapira, B.; Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Magn. Res.* **2006**, *178*, 33–41.

Por un lado se observa que la relación S/R es proporcional a \sqrt{N} , es decir, al número de puntos. Por otro lado, aunque la forma precisa del ruido depende de la electrónica del sistema, n_{rms} depende en general del ancho de banda del filtro (fbw) empleado durante el muestreo de la señal. El valor de fbw en general se define igual al ancho espectral para asegurar que la componentes de alta frecuencia del ruido no se solapan en el rango espectral que observamos. Es posible demostrar que n_{rms} es proporcional a \sqrt{fbw} . Por tanto, si se suplica la anchura espectral observada y con ello la anchura espectral del filtro, el ruido aumentará en un factor $\sqrt{2}$.

Un experimento 2D convencional consiste en N_1 experimentos 1D. La relación S/R de cada uno de estos experimentos vendrá dada por la ecuación 20, donde N se reemplaza por el número de puntos adquiridos a lo largo del dominio directo, N_2 . Una segunda transformada de Fourier a lo largo del dominio indirecto aumentará la relación S/R en un factor $\sqrt{N_1}$. Por tanto, en un experimento 2D convencional se cumplirá que:

$$S/R_{2D} = \frac{\sqrt{N_1 N_2} L M_0}{n_{rms}} \quad (21)$$

Es decir, la relación S/R aumenta según aumenta el número N_1 de experimentos o incrementos. En la RMN 2D ultrarrápida se adquiere un único *scan*, por lo que equivaldría al caso en el que $N_1 = 1$. Por tanto:

$$S/R_{UF} = \frac{\sqrt{N_2} L M_0}{n_{rms}} \quad (22)$$

donde N_2 es la resolución a lo largo del dominio directo y es igual al número de repeticiones de los gradientes en la secuencia EPSI. Comparando las ecuaciones 20 y 22 se observa que *por cada scan*:

$$\frac{S/R_{2D}}{S/R_{UF}} = \frac{n_{rms}^{UF}}{n_{rms}^{2D}} \quad (23)$$

Sin embargo, el nivel de ruido en ambos experimentos no es idéntico. En el experimento convencional la banda espectral a lo largo del dominio directo, SW_2 , establece el ancho de banda del filtro, fbw^{2D} . Por el contrario, en la UF-NMR 2D se adquieren los ecos a lo largo de un rango de frecuencias $\sim \gamma G_a L$ y por tanto el ancho de banda del filtro, fbw^{UF} , habrá de definirse al menos igual a $\gamma G_a L$ para asegurarse que los ecos no se distorsionan. Debido a que $\gamma G_a L = \gamma G_a T_a L / T_a = 2N_1 SW_2$ se tiene que:

$$\frac{S/R_{2D}}{S/R_{UF}} = \sqrt{\frac{fbw^{UF}}{fbw^{2D}}} = \sqrt{2N_1} \quad (24)$$

Esto nos indica que en la relación S/R, la UF-NMR 2D, comparada con la RMN 2D convencional, sufre una disminución en un factor $\sim \sqrt{N_1}$, siendo N_1 el número de incrementos del experimento tradicional.

II.3.3.5. Resolución y sensibilidad

La resolución de los experimentos de UF-NMR en la dimensión indirecta depende principalmente del valor del tiempo empleado para la codificación ([tabla II.1](#)). Sin embargo aumentar este valor hace que la relación S/R disminuya debido a las pérdidas de la intensidad de la señal debido a difusión o por relajación. Por otro lado, también dan lugar a distorsiones de las señales del espectro.⁷²

Estas pérdidas son mayores en los esquemas de codificación continua comparadas con las que se producen en el esquema discreto, debido a que el gradiente de codificación se aplica durante un tiempo mayor. Dentro de los experimentos de codificación continua, aquellos que emplean pulsos de 180°, como el esquema de tiempo constante, se encuentran más afectados por la relajación transversal.

En general, incluso para los esquemas de codificación continua, las pérdidas debidas a la difusión son menores que las producidas por la relajación.⁷³ Sin embargo, en el experimento HMQC las pérdidas por difusión son considerables debido a que es necesario aplicar gradientes de codificación muy intensos.

Giraudeau y colaboradores⁷⁴ han propuesto un esquema de codificación que utiliza un tren de pulsos adiabáticos que disminuye las pérdidas debidas a la difusión, al emplear gradientes más cortos. Por ello es posible aumentar el tiempo de codificación sin que se produzca una caída de la relación S/R. Sin embargo, este esquema es más sensible a problemas derivados de la inestabilidad de los gradientes comparado con los esquemas modulados en amplitud o de tiempo constante.

En general, se ha comprobado⁷⁵ que manteniendo los valores del tiempo de codificación por debajo de los 50 ms, las pérdidas debidas a la difusión son tolerables.

II.3.3.6. Consideraciones prácticas

Como ya hemos visto en la sección II.3.2 para la obtención del espectro de RMN ultrarrápido sólo es necesario realizar una transformada de Fourier a lo largo de la dirección t_2 . Los datos adquiridos no están distribuidos en una matriz 2D regular, necesaria para llevar a cabo una TF rápida. Un modo de resolver este problema es separar los datos adquiridos en dos conjuntos de datos, que sí están regularmente distribuidos, separados por un intervalo $2T_a$, y que pueden ser utilizados para la TF rápida. Cada uno de estos conjuntos de datos se transforma independientemente de modo que los espectros resultantes podrían ser sumados para dar lugar a un espectro que poseería una mayor relación S/R.

La suma de ambos espectros debe llevarse a cabo con precaución, ya que, debido a errores instrumentales, puede ocurrir que exista un desplazamiento de las señales en ambas direcciones k/v_1 y v_2 . En este caso es necesario realizar una corrección de dicho desplazamiento tomando uno de los espectros como referencia.

Como hemos visto, los valores de SW_1 y SW_2 ([tabla II.1](#)) dependen de la duración de intensidad de los gradientes de excitación y adquisición. El modo de conseguir

⁷² Giraudeau, P.; Akoka, S. *J. Magn. Reson.* **2008**, *195*, 9-16.

⁷³ Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 164513/1-164513/15.

⁷⁴ Giraudeau, P.; Akoka, S. *J. Magn. Reson.* **2008**, *190*, 339-345.

⁷⁵ Giraudeau, P.; Akoka, S. *J. Magn. Reson.* **2008**, *192*, 151-158.

anchuras espectrales mayores sería: (i) disminuir la duración del gradiente de adquisición, lo que llevaría a una disminución del número total de puntos adquiridos, y por tanto a una disminución de la resolución; (ii) aumentar la intensidad del gradiente de adquisición. Esta posibilidad conlleva varios efectos. El primero es que el valor máximo de la intensidad del gradiente que se puede alcanzar, depende de la instrumentación particular de cada espectrómetro. Por otro lado, gradientes más intensos producen mayores distorsiones de fase, mayores distorsiones en la forma del gradiente, mayores efectos de las corrientes de "eddy"⁷⁶ y mayores desajustes entre gradientes positivos y negativos; (iii) disminuir el valor del gradiente de excitación. En este caso el límite inferior es la longitud de la muestra, ya que, para el mismo rango espectral del pulso de RF, gradientes con menor intensidad dan lugar a la selección de una longitud espacial mayor; (iv) aumentar el tiempo t_1^{max} de la codificación espacial. En este caso podría producirse una reducción de la relación S/R debido a la pérdida de la señal por difusión y al aumento del tiempo en el que actúa la relajación T_2 .

También es necesario comentar el efecto que produce en la señal de resonancia las imperfecciones de los gradientes, como son, el desequilibrio entre el gradiente positivo y negativo dentro de un mismo ciclo y las diferencias de gradientes del mismo signo en cada paso del ciclo de adquisición (figura II.31).

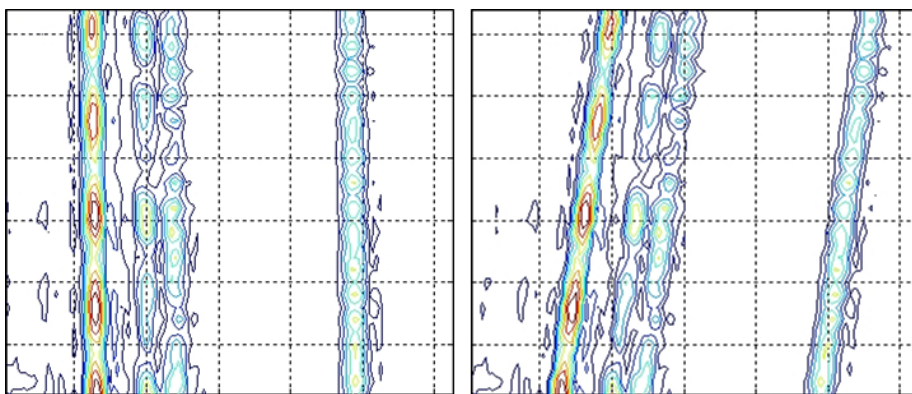


Figura II.31: Efecto de los desequilibrios entre gradientes positivos y negativos durante la excitación y la adquisición. (A) Señal adquirida bajo condiciones óptimas. (B) Señal cuando el comportamiento de los gradientes está lejos del ideal. El efecto producido por estos desequilibrios es el desplazamiento del eco a lo largo de t_2

Debido a estas imperfecciones de los gradientes, las señales a lo largo del dominio directo t_2 no aparecen alineadas, sino que se desplazan hacia valores de ν_1 menores o mayores en cada paso del bucle de adquisición. El efecto sobre el espectro de RMN es una pérdida de resolución. Ello puede ser corregido mediante una realineación de los datos a lo largo del eje t_2 antes de la transformación que dará el espectro.

Además de la posibilidad de compensar las imperfecciones de los gradientes mediante el realineamiento de los datos durante el tiempo de procesamiento de los datos, existe la posibilidad de corregir este desequilibrio durante la adquisición. Para ello será necesario aumentar o disminuir uno de los dos gradientes de adquisición en una cantidad

⁷⁶ Los rápidos cambios del campo magnético producidos por la aplicación de gradientes de campo magnético, generan corrientes inducidas en los componentes conductores que rodean a la muestra (soporte de la sonda de RF, bobinas de "shim", etc) que dan lugar a gradientes de campo magnético espurios dentro de la muestra.

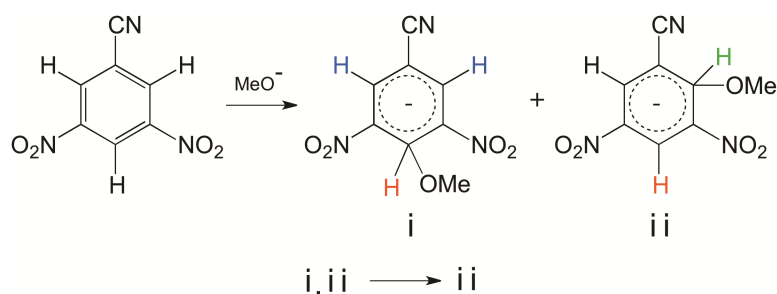
suficiente para compensar este desequilibrio. En este caso podría ser necesaria la adquisición de un experimento de prueba previo a la adquisición definitiva.

Es conveniente destacar que el método de trabajo para la obtención de los experimentos de UF-NMR puede variar debido a que es necesario definir diferentes parámetros de adquisición, algunos de los cuales están relacionados y de los que dependen características tan importantes como los parámetros espectrales. Además, el método de procesamiento de los espectros, que es diferente al empleado en la RMN tradicional, hace necesario el desarrollo de aplicaciones para la obtención del espectro. Por ello, en la bibliografía pueden encontrarse diferentes propuestas del esquema experimental.^{77,78}

II.3.4. Aplicaciones en sistemas químicos y biofísicos

Debido a los extraordinariamente cortos tiempos de adquisición de la UF-NMR, es evidente que una de las inmediatas posibilidades potenciales que ofrece es la de poder monitorizar transformaciones químicas y/o biofísicas en tiempo real. De hecho, la RMN permite el estudio de sistemas cuya cinética transcurre en escalas de tiempo situadas entre 10^{-7} y 10^{-3} s a través de medidas de relajación. Del análisis de la forma de línea se pueden extraer conclusiones sobre cambios en los alrededores de sistemas que transcurren en escalas de tiempo entre 10^{-2} y 10^0 s. El estudio de transformaciones que tienen lugar a menor velocidad (escalas de tiempo superiores) se puede llevar a cabo a partir de los cambios que aparecen en los espectros de RMN-1D o 2D en función del tiempo.^{79,80} El gran problema reside en que las escalas de tiempo necesarias para la realización de los experimentos convencionales de RMN-2D son habitualmente muy superiores a la de los sistemas a estudiar. La UF-NMR, cuya aplicación implica escalas de tiempo entre 10^{-1} y 10^1 s, ha comenzado a ayudar a superar este problema, como muestran seguidamente algunos ejemplos. Se excluyen aquí los presentados en esta Tesis, que se comentan en los Capítulos 2 y 3.

El primer ejemplo estudiado fue la aplicación de UF-TOCSY que ha permitido estudiar la generación y rápida transformación de los complejos de Meissenheimer i e ii, a través de la reacción del 3,5-dinitrobenzonitrilo (125 mM) con metóxido sódico.⁸¹ La reacción se realiza a 500 MHz y 16°C, en el interior de un tubo de RMN de 5mm (figura II.32).



⁷⁷ Gal, M.; Frydman, L. *eMagRes: Ultrafast Multidimensional NMR: Principles and Practice of Single-Scan Methods*; Wiley Online, 2008.

⁷⁸ Patha, M.; Charrier, B.; Tea, I.; Akoka, S.; Giraudeau, P. *Magn. Reson. Chem.* **2013**, 51 (3), 168-175.

⁷⁹ Dobson, C.M.; Hore, P.J. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 504-507.

⁸⁰ Ishima R.; Torchia, D.A. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 740-743.

⁸¹ Gal, M.; Mishkovsky, M.; Frydman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 951-956.

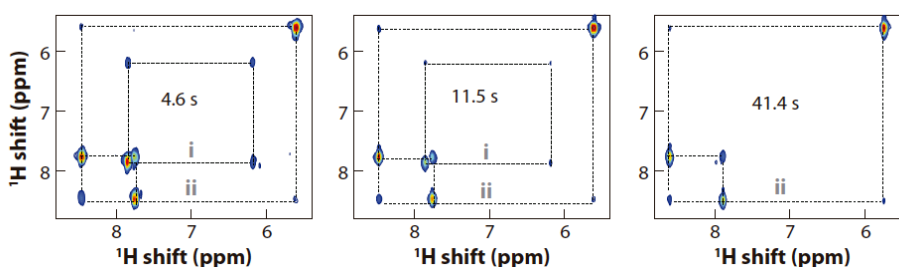


Figura II.32: Estudio de la formación y transformación de los complejos de Meissenheimer i e ii mediante UF-TOCSY.

La integración de las señales de correlación de los espectros ha permitido, además, calcular el tiempo de vida media del complejo i. La transformación transcurre en un tiempo inferior a 1 min, lo que da una idea de la excelente capacidad de monitorización de la secuencia UF-TOCSY.

Mediante UF-HSQC ^1H , ^{15}N se ha podido abordar el estudio sobre el intercambio H/D en biomoléculas como la ubiquitina 3.2 mM (4 scans/UF-HSQC) con buenos resultados (figura II.33). Los datos cinéticos obtenidos (tiempos de vida medio), mostrados en la figura II.34, acerca del intercambio de los residuos amídicos situados en diferentes posiciones, estuvieron en una buena concordancia con los conocidos a partir de Hadamard HSQC.⁸²

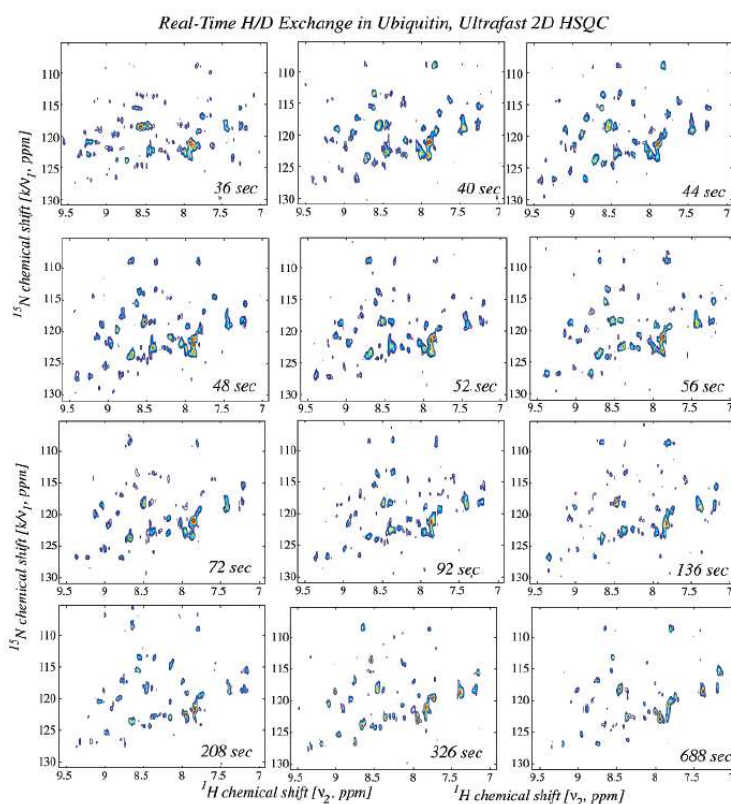


Figura II.33. Serie de experimentos 2D UF-HSQC ^1H , ^{15}N correspondientes al estudio del intercambio H/D en una solución de ubiquitina 3.2 mM.

⁸² Schanda, P.; Brutscher, B. J. Am. Chem. Soc. **2005**, 127, 8014-8015

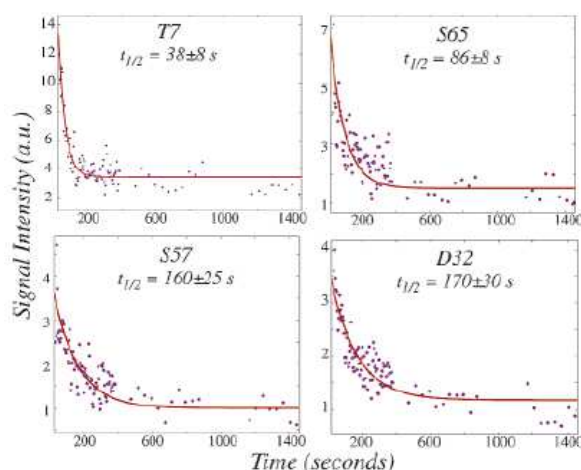


Figura II.34. Curvas cinéticas extraídas de las integrales de las señales de los espectros UF-HSQC de la figura II.31.

La metodología ultrarrápida también se ha aplicado al estudio de sistemas dinámicos en tiempo real en procesos de intercambio correspondientes a la rotación respecto de enlaces.⁸³

Recientemente, se ha empleado la UF-HSQC en el estudio cinético de la mutarrotación de la D-glucosa en D₂O.⁸⁴ Las constantes de mutarrotación para la α -D-glucosa y β -D-glucosa, calculadas a partir de los valores de las integrales de las señales HSQC obtenidas en función del tiempo (Figura II.35), se determinaron con una precisión del 10%.

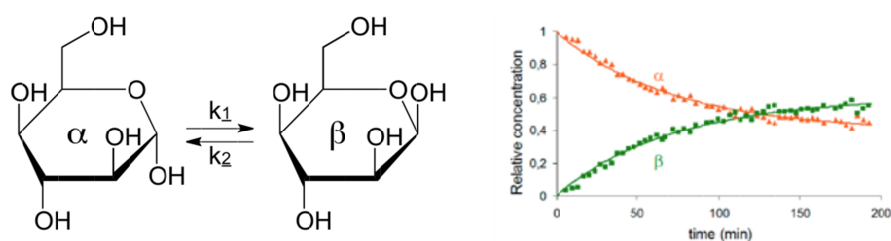


Figura II.35. Mutarrotación de la D-glucosa y cinética obtenida

El estudio de sistemas dinámicos y la aparición en ellos de intermedios de reacción, es otro aspecto de importancia mecanística. Además de los datos que en este sentido aporta esta memoria, cabe destacar aquí el estudio de monitorización en tiempo real sobre la hidrólisis del acetal 2-(4-nitrofenil)-1,3-dioxolano empleando UF-HSQC.⁸⁵ Se obtienen datos acerca de la formación del hemiacetal **2** formado como intermedio. Las señales de los CH₂ del intermedio, no observables en la anchura espectral accesible, se visualizan doblando controladamente esas señales en la zona visible del espectro (figura II.36).

⁸³ Saphira, B.; Frydman, L. *J. Magn. Reson.* **2003**, 165, 320–324.

⁸⁴ Giraudeau, P.; Lemeunier, P.; Coutand, M.; Doux, J. M.; Gilbert, A.; Remaud, G. S.; Akoka, S. *J. Spectrosc. Dyn.* **2011**, 1, 2.

⁸⁵ Queiroz Jr., L. H. K.; Giraudeau, P.; dos Santos, F. A. B.; de Oliveiraa, K. T.; Ferreira, A. G. *Magn. Reson. Chem.* **2012**, 50 (7), 496–501.

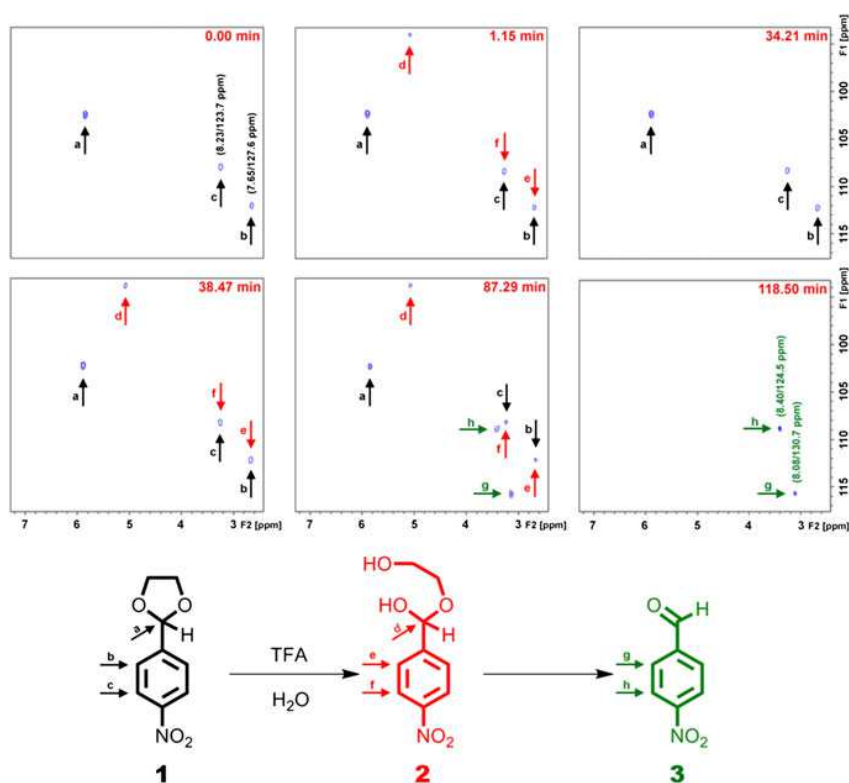


Figura II.36: Espectros UF-HSQC registrados en el transcurso de la hidrólisis de 2-(4-nitrofenil)-1,3-dioxolano. Se observan las señales del oxolano de partida **1**, el intermedio hemiacetalico **2** y el aldehído final **3**.

Un aspecto importante lo constituye el hecho de que el esquema de la UF-NMR se puede combinar fácilmente con el de otras técnicas rápidas de RMN, como, la espectroscopía Hadamard⁸⁶, la espectroscopía de proyección-reconstrucción⁸⁷, o la secuencia SOFAST. Mediante la combinación de UF-NMR y SOFAST-NMR, que optimiza el tiempo entre *scans*, se constituye la denominada espectroscopía *ultraSOFAST*, con la que ha sido posible optimizar el estudio del intercambio H/D de la ubiquitina 2mM en disolución y recalcular el tiempo de vida media del intercambio.⁸⁸ También se han realizado estudios de plegamiento de proteínas y la actuación de interruptores.⁸⁹

Los sistemas de polarización nuclear dinámica *ex situ* (DNP, Dynamic Nuclear Polarization) ofrecen la posibilidad de adquirir espectros de RMN de muestras de concentración muy baja (menores 1 mM), debido al aumento de la señal de resonancia producida por la hiperpolarización. Sin embargo, estos sistemas poseen un claro inconveniente ya que, tras la polarización, es necesario descongelar la muestra, debido a que la polarización se lleva a cabo a temperaturas criogénicas (1-2 K), y además la muestra debe ser transferida al equipo de RMN. Por ello, la polarización se pierde rápidamente y no es posible adquirir varios *scans* de intensidad comparable. Esto lo hace poco compatible con la mayoría de los experimentos de RMN 2D tradicional. Se ha aplicado una secuencia 2D UF-HSQC ^1H , ^{13}C a una muestra de piridina 0.47 mM no enriquecida polarizada mediante un sistema DNP⁹⁰. Este sistema además ofrece un aumento de la señal muy adecuado para las secuencias de UF-NMR, con lo que se

⁸⁶ Tal, A.; Shapira, B.; Frydman, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2732–2736.

⁸⁷ Mishkovsky, M.; Kupče, E.; Frydman, L. *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*, 034507-1–034507-8.

⁸⁸ Gal, M.; Schanda, P.; Brutscher, B.; Frydman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1372–1377.

⁸⁹ Leea, M.; Gal, M.; Frydman, L.; Varania, G. *PNAS*. **2010**, *107* (20), 9192–9197.

⁹⁰ Frydman, L.; Blazina, D. *Nature Physics*. **2007**, *3*, 415–419.

compensa su menor intensidad de señal comparada con la de las correspondientes secuencias tradicionales.^{91,92}

Recientemente se ha empleado una combinación de la secuencia de adquisición en paralelo PANSY, ya comentada, con secuencias 2D UF-NMR.⁹³ La secuencia PANSY emplea equipos de RMN dotados de receptores múltiples, lo que permite la adquisición simultánea de dos o más señales pertenecientes a núcleos diferentes. Con ello, se puede tener acceso a todas las secuencias necesarias para llevar a cabo una asignación estructural completa de pequeñas moléculas. La secuencia combinada se ha denominado 2D PUFSY (2D Parallel UltraFast Spectroscopy) y ha permitido obtener dos experimentos COSY en un único *scan* (Figura II.37).

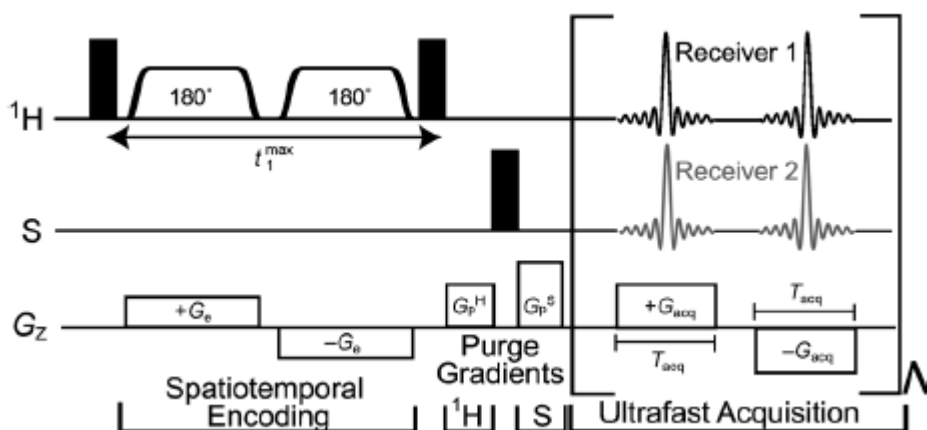


Figura II.37: Secuencia de pulsos para la adquisición simultánea de correlaciones ultrarrápidas ^1H - ^1H y ^1H -S, en donde S es un heteronúcleo. N es el número de ciclos con gradientes alternantes empleados en t_2 .

La secuencia se ha aplicado a la obtención en paralelo en un solo *scan* de espectros UF-COSY ^1H , ^1H y correlaciones heteronucleares ^1H , ^{19}F de una muestra de ácido 2,3,4-trifluoro cinámico y de una mezcla de ácido 2,3,6-trifluoro benzoico, ácido 2,3,4-trifluoro cinámico y ácido 2,4,5-trifluoro benzoico como se muestra en la figura II.38.

Aunque el uso de receptores múltiples, necesarios para esta técnica, se encuentra cada vez más extendido, todavía no constituye un estándar en los equipos de resonancia comerciales.

⁹¹ Shapira, B.; Morris, E.; Muszkat, K. A.; Frydman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11756-11757.

⁹² Giraudeau, P.; Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13902-13903.

⁹³ Donovan, K. J.; Kupče, E.; Frydman, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1-5.

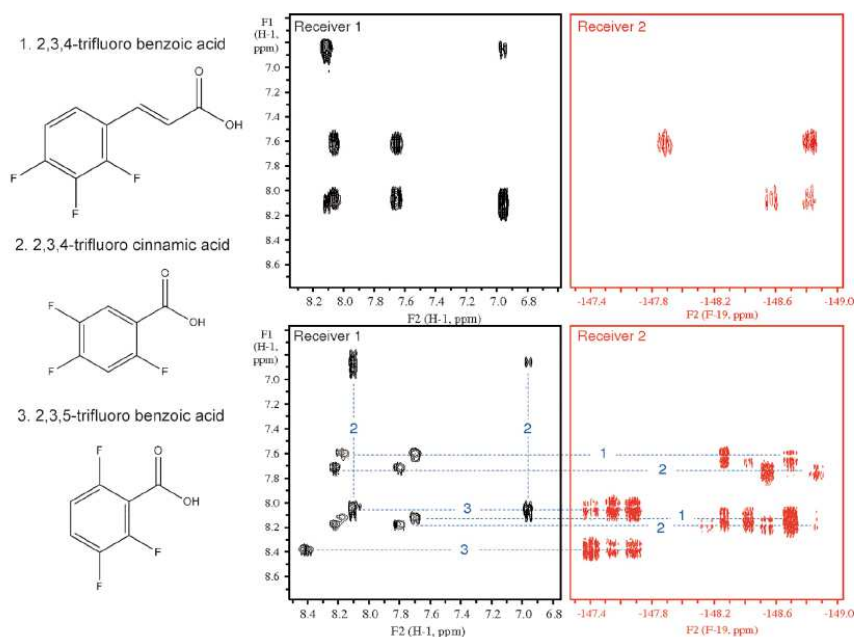


Figura II.38: Espectros PUFSY COSY de una mezcla de 1) ácido 2,3,6-trifluoro benzoico, 2) ácido 2,3,4-trifluoro cinámico y 3) ácido 2,4,5-trifluoro benzoico. Los espectros de correlación ^1H , ^1H se encuentran presentados en negro, mientras que los de correlación ^1H , ^{19}F muestran en rojo.

Dentro del contexto de las aplicaciones analíticas de la *UF-NMR* cabe destacar el empleo de las secuencias *ultrarrápidas* en el análisis cuantitativo de muestras complejas, p.e. para la determinación de concentraciones de metabolitos^{94,95,96}, o para la determinación del enriquecimiento de ^{13}C en muestras biológicas.^{97,98}

Otra aplicación analítica de la *UF-NMR* consiste en su empleo como técnica para la monitorización de muestras complejas en HPLC-RMN. En los sistemas continuos de separación cromatográfica de líquidos acoplados a un sistema de RMN, no es posible adquirir espectros bidimensionales tradicionales debido a los altos tiempos de adquisición de estos experimentos, incompatibles con sistemas que trabajan de forma continua, que necesitan adquisiciones cortas en tiempo real, por lo que en general se adquieren experimentos de RMN 1D. La introducción de la *UF-NMR* como técnica de monitorización que permite el registro de RMN 2D en 1 *scan*, ofrece las características y resultados adecuados. Así, mediante *UF-COSY* se han descrito condiciones experimentales para la implementación *on line* HPLC/*UF-NMR*. De esta forma se adquieren espectros *UF-COSY* cada 12 s en el curso de la separación cromatográfica. Ello abre el camino a la utilización de esta metodología en aplicaciones en las que la HPLC-RMN constituye la rutina analítica de elección.^{99,100}

⁹⁴ Giraudeau, P.; Remaud, G. S.; Akoka, S. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 479-484.

⁹⁵ Le Guennec, A.; Tea, I.; Antheaume, I.; Martineau, E.; Charrier, B.; Pathan, M.; Akoka, S.; Giraudeau, P. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 10831-10837.

⁹⁶ Martineau, E.; Tea, I.; Akoka, S.; Giraudeau, P. *NMR Biomed.* **2012**, *25*, 985-992.

⁹⁷ Giraudeau, P.; Massou, S.; Robin, Y.; Cahoreau, E.; Portais, J.; Akoka, S. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 3112-3119.

⁹⁸ Giraudeau, P.; Cahoreau, E.; Massou, S.; Pathan, M.; Portais, J.; Akoka, S. *ChemPhysChem.* **2012**, *13*, 3098-3101.

⁹⁹ Shapira, B.; Morris, E.; Muszkat, K. A.; Frydman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1262-1265.

¹⁰⁰ Queiroz, Jr. L. H. K.; Queiroz, D. P. K.; Dhooghe, L.; Ferreira, A. G.; Giraudeau, P. *Analyst.* **2012**, *137*, 2357.

UF-NMR emplea la codificación espacial para monitorizar las frecuencias en el dominio indirecto. Esta dependencia espacial es eliminada posteriormente mediante un gradiente inverso durante este periodo de codificación. Sin embargo, es posible conservar esa información espacial eliminando dicho gradiente. Además las secuencias de espectroscopía de UF-NMR realizan la decodificación de las frecuencias ν_1 mediante la repetición de gradientes bipolares durante la adquisición. Esta decodificación no posee información espacial, pero si se añade un gradiente en una dirección ortogonal durante la adquisición es posible codificar la información espacial en esta dirección ortogonal. De este modo es posible adquirir una imagen de RM en un solo *scan*.¹⁰¹ Los datos proporcionados por este tipo de imagen pueden ser analizados para obtener además información espectral, dando como resultado imágenes espectroscópicas obtenidas en un único *scan*.¹⁰² Estas imágenes, aunque poseen una sensibilidad menor que las imágenes EPI, son menos sensibles a los cambios de susceptibilidad magnética, lo que las hace adecuadas para el estudio funcional (fMRI) de zonas del cerebro en las que los cambios de susceptibilidad de los tejidos hacen muy difícil el uso de secuencias EPI y de secuencias de eco de gradiente.¹⁰³

II.3.5. Ventajas e inconvenientes

La UF-NMR se trata sin dudas de una metodología muy prometedora que permite la obtención de espectros 2D (nD), en tiempos inferiores a 0.2 s, en un único scan o en un número reducido de ellos. Ello ha abierto toda una serie de expectativas para sus posibilidades de aplicación en la monitorización de una serie creciente de sistemas dinámicos químicos y biológicos. Así, han comenzado a describirse valiosos resultados resultantes de la utilización de la UF-NMR para el estudio de aspectos relacionados con el mecanismo de las reacciones y de sus aplicaciones analíticas cuantitativas y en el seguimiento de moléculas en sistemas de flujo continuo. Se trata además de una metodología compatible con las características técnicas de los equipos de RMN de configuración estándar, que asimismo permite su combinación con otras conocidas variantes técnicas empleadas en la reducción de los tiempos de adquisición de los experimentos 2D de RMN. Son varias e importantes las ventajas que aporta la UF-NMR, si bien existen también diferentes dificultades que supone su aplicación.

La UF-NMR no es una técnica que se encuentre implementada en el extenso panel de secuencias que ofrecen los fabricantes de equipos de RMN. Por ello, debido a sus diferencias conceptuales y de características con la RMN clásica, es necesario recurrir a un software específico para poder calcular los parámetros de adquisición en la realización de experimentos. Tampoco existe un software estándar para el procesamiento de los datos y el tratamiento de los espectros. Por otro lado, aparte de su menor sensibilidad comparada con la RMN clásica, la UF-NMR presenta problemas de amplitud de la ventana espectral, derivados de su dependencia de los gradientes y de las características de estos. Ello hace que, con frecuencia, los espectros ultrarrápidos presenten señales dobladas, así como artefactos ocasionales. En modo alguno se puede decir pues que, hasta ahora, la UF-NMR se trate de una técnica *asequible* para los no especialistas, incluso disponiendo de todas las herramientas necesarias. Además, la UF-NMR es muy

¹⁰¹ Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Magn. Reson.* **2005**, *172*, 179–190.

¹⁰² Tal, A.; Frydman, L. *J. Magn. Reson.* **2007**, *189*, 46–58.

¹⁰³ Ben-Eliezer, N.; Goerke, U.; Ugurbil, K.; Frydman, L. *Magn. Reson. Imaging.* **2012**, *30*, 1401–1408.

exigente con el hardware del espectrómetro, principalmente con el módulo de gradientes, por lo que se deben tomar precauciones que eviten posibles averías.

En resumen, sobre la UF-NMR se puede decir que se trata de una metodología de aplicación complicada, pero que sin lugar a dudas puede aportar resultados únicos.

III. Objetivos

Objetivos

Esta Tesis nace de la necesidad de desarrollar métodos de RMN que ayuden a superar las dificultades en cuanto al tiempo de realización de experimento que posee la RMN tradicional. La publicación de los principios de la *RMN ultrarrápida* ha supuesto que se puedan abordar reducciones impensables en el tiempo de adquisición, lo que ha abierto nuevos horizontes de utilización de esta técnica prometedora. Sin embargo, estas técnicas no se encuentran disponibles en los espectrómetros de RMN comerciales y tampoco se dispone de los programas necesarios para el cálculo de los parámetros de los experimentos, obtención de datos, procesado y optimización de los espectros.

El objetivo principal de esta Tesis reside pues en la puesta en marcha de la *RMN ultrarrápida* en los espectrómetros del CAI de RMN y RSE de la UCM, en la evaluación de sus características y en las posibilidades de aplicación en el estudio de sistemas dinámicos en tiempo real.

Para ello se estudiarán los diferentes esquemas de la codificación espacial necesaria y la realización del experimento básico de *RMN ultrarrápida*. Se pondrá a punto la herramienta necesaria para el cálculo de los parámetros básicos para la realización de los experimentos. Se escribirán los programas de pulsos de las secuencias de *RMN ultrarrápida* fundamentales para el estudio de correlaciones homo y heteronucleares escalares y dipolares. Se optimizarán las secuencias y los detalles experimentales en cada caso. Se desarrollará el programa para el procesado y optimización de los datos y espectros obtenidos.

Se estudiarán las posibilidades de monitorización en tiempo real de sistemas dinámicos mediante *RMN ultrarrápida*.

IV. Metodología

CAPÍTULO 1: REALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO DE RMN ULTRARRÁPIDO: PASOS NECESARIOS

Este capítulo se centra en la realización de las diferentes etapas para la adquisición de un experimento de UF-NMR y en particular del *experimento básico* de UF-NMR. Dicho experimento consiste en la obtención en un único barrido de un espectro 2D homonuclear en el que no se aplica etapa de mezcla alguna, por lo que no se observa ningún tipo de correlación. Simplemente se obtiene la diagonal del experimento homonuclear tradicional, como se muestra en la figura 1.1.

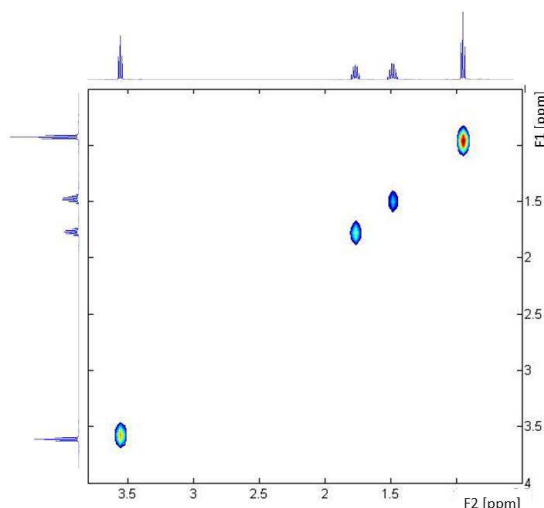


Figura 1.1. Experimento UF-NMR básico del cloruro de butilo. El espectro se ha adquirido a 500 MHz sobre una muestra 300 mM y empleando una sonda BBO.

Como ya se ha comentado en la introducción, en las secuencias de RMN ultrarrápidas, tanto la codificación de la dimensión indirecta como la decodificación de dicha dimensión durante la adquisición *no* se realizan siguiendo los mismos esquemas de la RMN tradicional. Por ello, en los espectrómetros actuales no existen programas escritos que generen los gradientes y pulsos necesarios para la realización de un experimento de UF-NMR. Además, como también se expuso en la sección II.3.3.1, los valores de las anchuras espectrales en los dominios indirecto y directo, SW_1 y SW_2 , se calculan a partir de los parámetros de los gradientes y los pulsos de la secuencia de UF-NMR; es decir, no pueden definirse directamente del mismo modo que se hace en las secuencias tradicionales. Por otro lado, los programas actuales de obtención y procesamiento de los espectros de resonancia tampoco permiten obtener el espectro de RMN ultrarrápida.

Todo lo anterior hace necesaria la realización de unos pasos previos a la obtención de un espectro de RMN ultrarrápido:

1.1. Programa de pulsos

En la figura 1.2 se muestra el esquema de la secuencia 2D de UF-NMR de *codificación continua* más sencilla. En este caso la codificación se obtiene mediante la irradiación con pulsos *chirp* de excitación que permiten la *codificación en amplitud* del dominio t_1 .

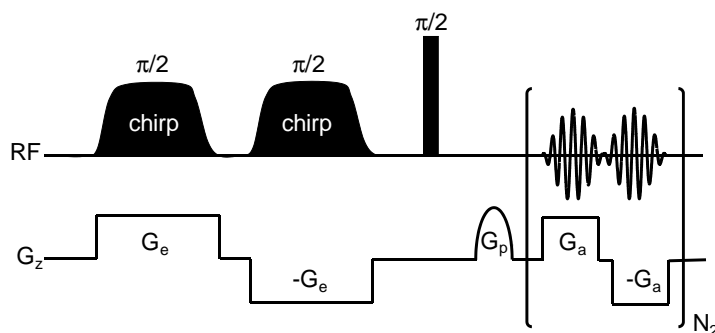


Figura 1.2. Esquema de la secuencia básica con codificación continua modulada en amplitud.

En esta secuencia la selección espacial se realiza mediante dos gradientes $+G_e/-G_e$ aplicados simultáneamente con dos pulsos *chirp* de 90° . El primer pulso permite la evolución espacialmente selectiva según t_1 de los espines a lo largo de la muestra, mientras que el segundo permite el almacenamiento de dicha evolución en el eje longitudinal. Al finalizar la codificación espacial, para su almacenamiento se aplica un pulso *duro* de 90° que devuelve la magnetización, que ya se encuentra codificada según la frecuencia ν_1 , al plano transversal para ser medida.

La adquisición de la señal así codificada se realiza mediante una secuencia EPSI, como se ha comentado en el apartado II.3.2.9. Para ello se aplica una serie de N_2 ciclos de gradientes bipolares $+G_a/-G_a$ que, además de decodificar la información espectral según el dominio indirecto, permite la codificación según el tiempo de evolución t_2 .

Previo a esta adquisición se aplica un pulso de gradiente de campo magnético que permite centrar el espectro de RMN ultrarrápida en la ventana de adquisición, además de desfazar la magnetización transversal no deseada.

Se han escrito los programas de pulsos necesarios para la realización de los experimentos 2D de RMN ultrarrápida. Estos programas ejecutan todos los pulsos y gradientes necesarios. Las [secuencias de pulsos](#) están escritas en el lenguaje propio del programa TOPSPIN empleado en los espectrómetros Bruker utilizados. Los listados de los programas se han incluido en el Apéndice A.

Estas secuencias de UF-NMR de codificación continua modulada en amplitud utilizan pulsos *chirp* de excitación. Como ya se ha comentado, tanto la anchura espectral, $\Delta\Omega_{RF}$, como el tiempo de dichos pulsos, T_e , influyen en otros valores del espectro. Así, la anchura espectral del pulso influye en la longitud de la muestra afectada por la codificación espacial según:

$$\Delta\Omega_{RF} = \gamma_e G_e L \quad (1.1)$$

Esta longitud debe ser lo más aproximada a la longitud real de la muestra para evitar que haya partes de ella que no sean irradiadas o que se irradien zonas donde no haya muestra. Además, como se indicó en la sección II.3.3.2 de la introducción, se ha de cumplir que $\Delta\Omega_{RF} \gg SW_1$ para evitar pérdidas y distorsiones.

La longitud del pulso *chirp* en este esquema (figura 1.2) corresponde a la mitad del tiempo de codificación espacial ($T_e = t_1^{max}/2$) y define la resolución del espectro en la dimensión indirecta, t_1 :

$$\Delta\nu_1 = \frac{1}{t_1^{max}} \quad (1.2)$$

Por tanto, la longitud del pulso posee una influencia inmediata en la resolución del espectro en la dimensión indirecta. Además, estos parámetros afectan al valor de la anchura espectral del dominio indirecto SW_1 , que para el esquema codificado modulado en amplitud se define:

$$SW_1 = \left| \frac{\Delta\Omega_{RF}\gamma_a G_a T_a}{2\gamma_e G_e T_e} \right| \quad (1.3)$$

donde γ_a , G_a y T_a son, respectivamente, la constante giromagnética, intensidad y tiempo de aplicación del gradiente de decodificación y γ_e , G_e y T_e , la constante giromagnética, intensidad y tiempo de aplicación del gradiente de codificación, respectivamente.

De la expresión anterior se deduce que es posible conseguir el mismo valor de SW_1 usando diferentes valores de $\Delta\Omega_{RF}$ y T_e del pulso. Para cada pulso, por tanto, es necesario ajustar otros parámetros de la secuencia, como por ejemplo, la intensidad de los gradientes de la codificación, G_e , que según se deduce de la ecuación (2.1), influye en la fracción de la muestra afectada por la codificación espacial. También es necesario ajustar la intensidad o duración del gradiente de adquisición, G_a y T_a , teniendo en cuenta que T_a define directamente el valor de la anchura espectral en el dominio directo:

$$SW_2 = \frac{1}{2T_a} \quad (1.4)$$

y que G_a está limitado por el valor máximo posible del sistema de gradientes usado en el experimento.

Dependiendo de los valores de: las anchuras espectrales buscadas, del núcleo estudiado en la dirección indirecta, del campo magnético del espectrómetro, de la sonda empleada y del esquema de codificación, se han generado diferentes pulsos *chirp* empleando el programa *ShapeTool* del paquete TOPSPIN, como se indica en la [sección VI.2](#). En el Apéndice A se ha incluido el fichero del pulso para el caso de un pulso *chirp* de 90° de excitación con un ancho de banda de 60 kHz y un tiempo de 10 ms.

El procedimiento para la generación de los pulsos en los equipos de 500 y 700 MHz ha sido exactamente el mismo.

1.2. Herramientas informáticas

Para la obtención de los experimentos de RMN ultrarrápida no es posible aplicar los procedimientos habituales de la RMN tradicional existentes en los espectrómetros, por lo que ha sido necesario *desarrollar programas informáticos* que realicen los pasos necesarios para poder llevar a cabo estos nuevos experimentos. Todos los programas han sido desarrollados empleando el lenguaje de programación *Matlab 7.11* (Mathworks, EEUU).

Los programas que se presentan en este capítulo, necesarios para el cálculo de los parámetros de adquisición y la obtención del espectro de UF-NMR son: *paramadq* y *XprocSS*.

El programa [*paramadq*](#) (Anexo B) permite calcular de forma interactiva y mediante una interfaz gráfica los parámetros de adquisición de la secuencia que permiten obtener las anchuras espectrales deseadas.

El programa calcula el tiempo de adquisición T_a dependiendo del valor de la anchura espectral de la dimensión directa, SW_2 , pues ambos parámetros están relacionados según la ecuación (2.4). El valor de T_a dado por esta ecuación incluye el tiempo de establecimiento y apagado de los gradientes. En los programas de pulsos escritos durante el desarrollo de esta Tesis doctoral, el tiempo de establecimiento del gradiente se ha considerado incluido en el tiempo de decodificación, mientras que se ha separado el tiempo de apagado de los gradientes, necesario para que el programa de pulsos funcione correctamente. Por ello, el programa *paramadq* calcula el tiempo de adquisición sin incluir el valor del tiempo de apagado de los gradientes, el cual puede ser definido por el usuario (*rise time*). El valor por defecto de este tiempo es 40 μ s por ser este el valor mínimo necesario en el espectrómetro AV500 empleado en el desarrollo de esta Tesis doctoral. Este tiempo es posible eliminarlo durante el procesamiento de los datos, ya que durante este periodo de tiempo se adquieren datos no válidos para el espectro, lo cual resulta en una disminución de la anchura espectral SW_1 aunque sin pérdida de resolución.

Los valores del ancho de banda del pulso *chirp* de codificación, $\Delta\Omega_{RF}$, y del gradiente de codificación G_e , que son elegidos por el usuario, permiten el cálculo de la relación entre la longitud afectada por el pulso *chirp* y el gradiente de codificación, $Z_{efectivo}$, y la longitud máxima, Z_{maxima} , que corresponderá con la longitud de la sonda.

Finalmente, mediante la selección de la longitud del pulso adiabático y del gradiente de adquisición se seleccionan los valores de T_e y G_a que permitirán establecer un valor de la anchura de banda SW_1 del dominio indirecto.

En el caso de la secuencia de codificación continua de tiempo constante, el valor de SW_1 es la mitad del valor calculado mediante la ecuación (2.1), por lo que para conseguir el mismo valor de anchura espectral sería necesario modificar las variables de dicha ecuación. Por ejemplo, se podría aumentar el valor de T_a , lo que conduce a una disminución de la anchura espectral de la dimensión directa, SW_2 . También es posible aumentar el valor de G_a , si bien ello tiene como límite el valor máximo que pueda alcanzar el gradiente, lo que depende de la sonda utilizada. Además este gradiente oscila y se repite durante la adquisición lo que, si la intensidad del gradiente es muy alta, puede conducir a que la sonda se caliente e incluso pueda sufrir daños que requieran una intervención técnica¹⁰⁴. También es posible aumentar el valor de SW_1 aumentando el valor de $\Delta\Omega_{RF}$ o disminuyendo el valor de G_e . Estos valores afectan a la longitud de la codificación lo que, como se ha comentado, puede llevar a tener zonas de la muestra no irradiadas o zonas vacías que sí son irradiadas. Finalmente sería posible aumentar SW_1 disminuyendo el valor de T_e ; sin embargo esto produciría una disminución de la resolución en esta dimensión. En la mayoría de los experimentos de tiempo constante adquiridos a lo largo del desarrollo de esta Tesis se ha optado por el aumento del

¹⁰⁴ Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral ha sido necesaria la intervención técnica para la reparación del sistema de gradientes de la sonda BBO del equipo AV500 del CAI de RMN y RSE de la UCM debido a la repetición (96 pasos de la secuencia EPSI y 16 *scans*) de un gradiente intenso (80% del valor máximo del gradiente) con un tiempo de repetición entre *scans* insuficiente (5 segundos) en el proceso del desarrollo de la secuencia UF-HSQC de una muestra de estricnina 40 mM.

gradiente de decodificación, G_a . En los casos en los que esto no es posible ha sido necesario disminuir el tiempo de codificación, T_e .

The screenshot shows the 'paramadq' software window with three main colored sections for parameter input and calculation:

- Yellow Section (Top):**
 - Frecuencia del espectrometro (MHz): 500
 - Nucleo: 1H (dropdown menu)
 - Gradiente maximo (G/cm): 53.5
 - Longitud de la sonda (cm): 1.8
- Green Section (Middle):**
 - Gradiente de excitacion (%): 10.0
 - Ancho de banda del pulso adiabatico (kHz): 50.0
 - Z efectivo / Z maximo: 1.2217 (calculated)
- Cyan Section (Bottom):**
 - Anchura espectral en F2 (ppm): 4.00
 - Longitud del pulso adiabatico (ms): 10.0
 - rise time (us): 40
 - Gradiente de adquisicion (%): 38
 - Tiempo de adquisicion (us): 210
 - Anchura espectral en F1 (ppm): 3.99 (calculated)

A red 'Calcular' button is located at the bottom center of the window.

Figura 1.3. Ventana interactiva del programa *paramadq* para el cálculo de los parámetros de adquisición de la secuencia de UF-NMR de codificación continua modulada en amplitud.

La ventana principal del programa *paramadq* se muestra en la figura 1.3.

Para la determinación de los parámetros de adquisición es necesario establecer previamente los siguientes parámetros:

- *Intensidad del campo magnético* de trabajo.
- *Núcleo*: ^1H para experimentos homonucleares, ^{13}C , ^{15}N o ^{31}P para experimentos heteronucleares.
- *Valor*, en G/cm, *del gradiente máximo* permitido por la sonda de gradientes utilizada.
- *Longitud de la sonda*, que corresponderá con la longitud máxima que se puede excitar con dicha sonda.

Como se puede observar, dichos parámetros se encuentran ubicados en la parte superior de la ventana del programa.

Los valores situados a la izquierda de la parte intermedia e inferior de la ventana del programa son valores de entrada. Estos valores se ajustan para obtener los valores óptimos de los parámetros situados en la zona derecha de la ventana, de modo que:

- La relación entre la longitud realmente excitada y la longitud de la sonda, *Z efectivo / Z máximo*, se aproxime a 1.
- El valor del tiempo de adquisición sea el adecuado para conseguir la anchura espectral en F2 deseada.

- La anchura espectral en la dirección de F1 sea la que corresponda para el espectro que se busca.

Estos valores se introducen como parámetros de adquisición de la secuencia de pulsos programada. Por ejemplo, el tiempo de adquisición T_a define el parámetro p13 de los programas de pulsos.

A diferencia de la RMN tradicional los programas disponibles en los espectrómetros comerciales no se pueden aplicar directamente para el procesamiento de los espectros de UF-NMR. Por ello resulta imprescindible desarrollar programas que realicen todos los pasos necesarios. Este desarrollo puede llevarse a cabo en diferentes plataformas y utilizando diferentes lenguajes. Así, es posible llevarlo a cabo empleando el lenguaje de programación *Python* bajo el propio programa TOPSPIN de Bruker.¹⁰⁵

En el caso presentado en esta memoria se ha desarrollado un programa independiente del programa comercial de Bruker, que puede usarse en diferentes plataformas, con datos procedentes de otros espectrómetros o con otros formatos. La serie de programas XprocSS desarrollados permiten disponer de todas estas variantes. Los programas están escritos, como se ha comentado anteriormente, usando el lenguaje de programación Matlab 7.11.

En su versión inicial, los programas XprocSS trabajan con los datos procedentes de los espectrómetros Bruker. Además permiten realizar un procesamiento básico de los datos previo a la realización de la transformada de Fourier. Todos los pasos se realizan de forma interactiva empleando una interfaz gráfica.

La ventana principal del programa se muestra en la figura 1.4.

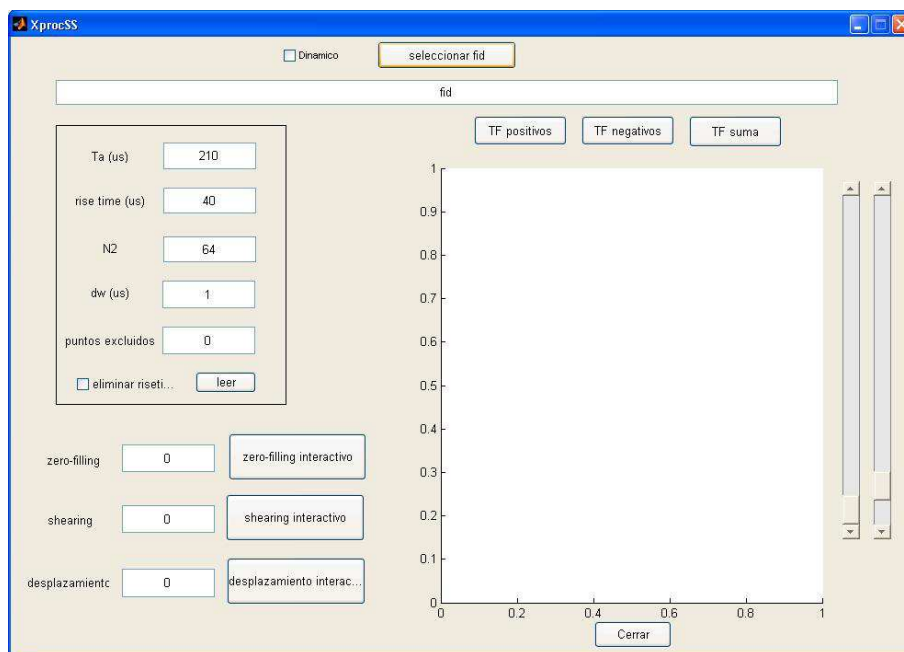


Figura 1.4. Ventana principal del programa XprocSS para la lectura y procesamiento de los datos adquiridos mediante una secuencia de pulsos de UF-NMR.

¹⁰⁵ Giraudeau, P.; Akoka, S. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, 49, 307-313.

El primer paso necesario consiste en seleccionar el fichero de los datos adquiridos, que en caso de los espectrómetros utilizados en la realización de esta Tesis se denominan *fid* (figura 1.5). Los datos almacenados en estos ficheros se muestrean de forma continua por lo que es necesario separarlos y reordenarlos en las matrices de datos $S_{pos}(k/v_1, t_2)$ y $S_{neg}(k/v_1, t_2)$. Para ello es necesario conocer algunos parámetros de la adquisición (figura 1.6).

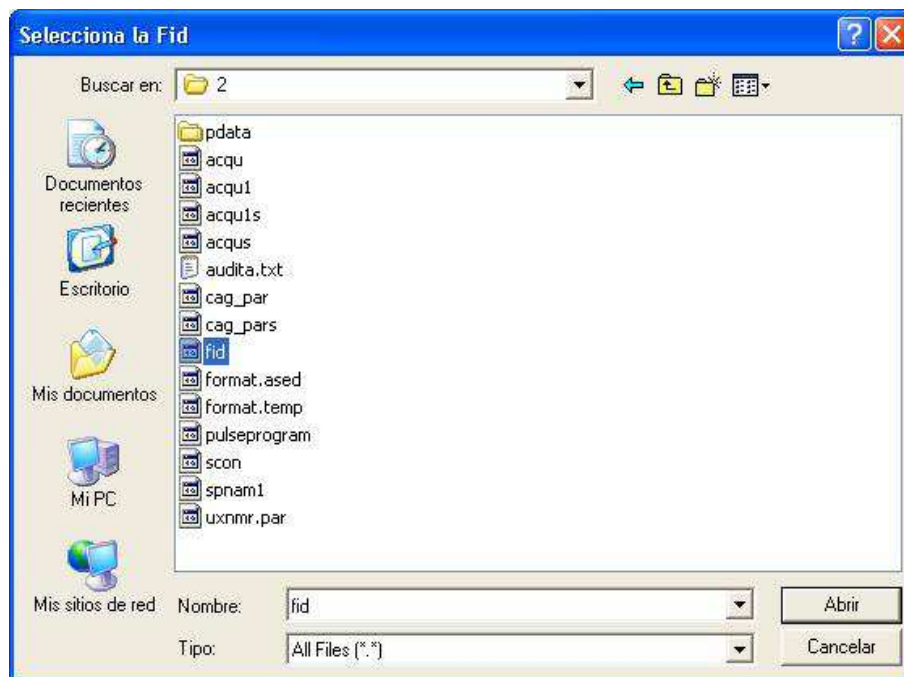


Figura 1.5. Ventana de selección del fichero de almacenamiento de los datos adquiridos mediante una secuencia de UF-NMR. En el caso de los datos de un espectrómetro Bruker adquiridos con el programa TOPSPIN, este fichero se denomina *fid*.

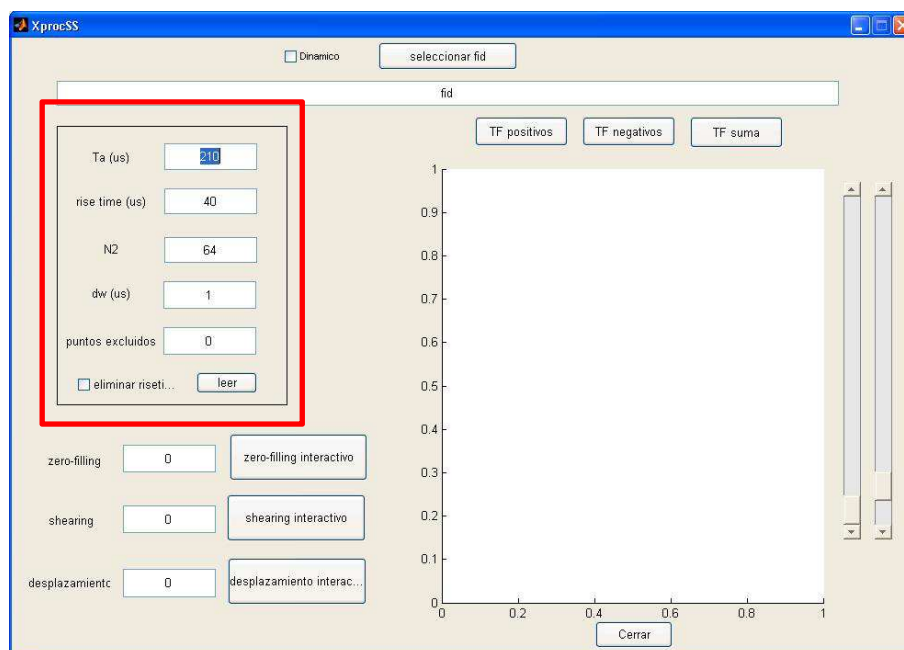


Figura 1.6. Zona de la ventana principal del programa XprocSS en la que se encuentran los parámetros necesarios para la lectura y reordenación de los datos. Todos los parámetros se pueden editar.

El tiempo de adquisición T_a sumado al tiempo de estabilización de los gradientes (*rise time*), dividido por el tiempo necesario para el muestreo de cada punto (*dw*), proporciona el número de puntos adquiridos durante cada gradiente individual positivo o negativo, es decir, el número de puntos de la dimensión del espectro en la dirección k/v_1 . El valor del número de pasos que se repiten en la secuencia EPSI, N_2 , proporciona el número de puntos de la dimensión del espectro en la dirección t_2 .

Por último se introduce la variable *puntos excluidos*. Esta variable depende del espectrómetro y del tipo de adquisición. Cuando se emplean filtros digitales en el muestreo de los datos se introduce un conjunto de puntos nulos al inicio de los datos sin transformar como consecuencia de la utilización de dichos filtros. Estos puntos pueden ignorarse utilizando este parámetro. En el caso de adquisiciones analógicas, que no emplean dichos filtros digitales, no existen puntos nulos iniciales.

En el programa se ha introducido la posibilidad de eliminar del análisis los puntos adquiridos durante el tiempo de estabilización de los gradientes. Durante este tiempo el gradiente se desconecta, por lo que los datos adquiridos en este periodo no contienen información espectral válida. Si se excluyen del análisis no se pierde información espectral y la resolución en la dimensión indirecta se conserva, pero se reduce la anchura espectral en la dirección F_1 .

Utilizando los parámetros que proporciona el programa es posible leer correctamente los datos adquiridos y, además, ordenarlos y separarlos en dos conjuntos de datos procedentes de la adquisición correspondientes a los datos obtenidos durante los gradientes positivos y los negativos. Con ambos conjuntos se construyen dos matrices, $S_{pos}(k/v_1, t_2)$ y $S_{neg}(k/v_1, t_2)$, con las que se trabaja por separado y que darán lugar a dos espectros aproximadamente iguales (figura 1.7).

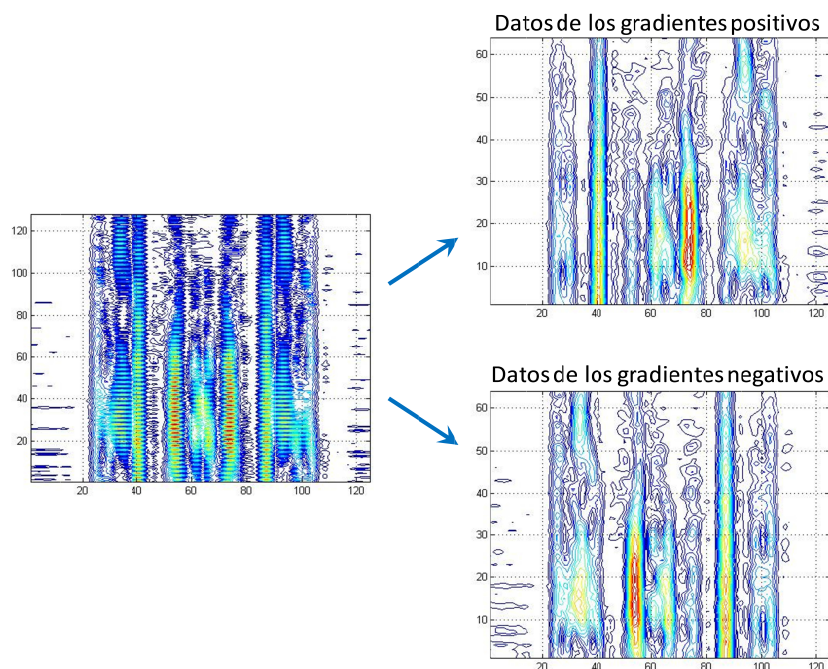


Figura 1.7. División de los datos adquiridos mediante una secuencia de UF-NMR. A la izquierda vemos el resultado de la matriz una vez reordenados los datos en una matriz bidimensional. En dicha matriz se encuentran mezclados los datos adquiridos durante los gradientes positivos y negativos. Estos datos no están equiespaciados, condición necesaria para aplicar la transformada de Fourier. Por ello los datos se separan en dos matrices (derecha de la figura) con los datos procedentes de cada gradiente.

Una vez separados los datos, en la ventana de procesado se muestran los procedentes de la adquisición durante los gradientes positivos. En el eje horizontal se representa la dirección k/v_1 y en el eje vertical la dirección t_2 (figura 1.8).

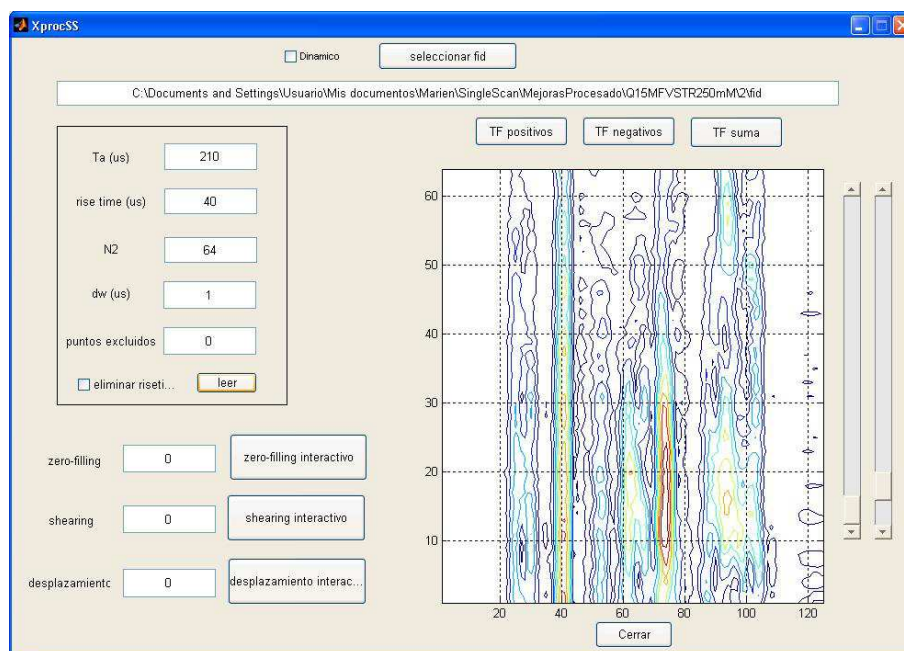


Figura 1.8. Ventana del programa XprocSS en el que se muestran los datos de la secuencia UF-NMR antes de la aplicación de la transformada de Fourier. Los datos mostrados son los que se adquieren durante el gradiente positivo.

Cada una de las filas de la matriz $S_{pos}(k/v_1, t_2)$, constituye un espectro monodimensional respecto de v_1 , por lo que para obtener el espectro bidimensional sólo es necesario realizar la transformación de Fourier respecto a la dirección t_2 .

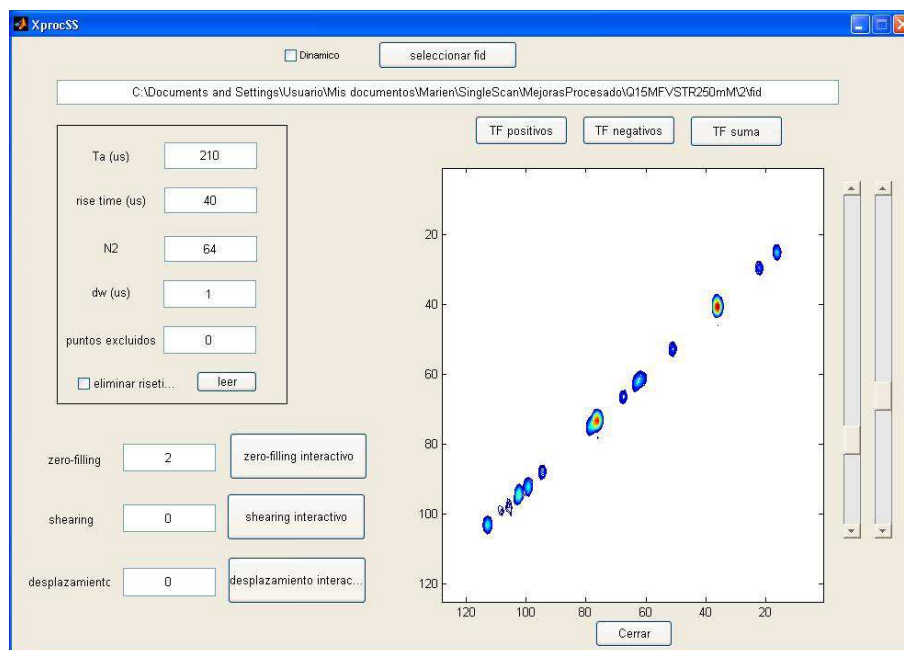


Figura 1.9. Ventana del programa XprocSS en el que se muestra el espectro de UF-RMN una vez realizada la transformada de Fourier a lo largo del eje t_2 .

Mediante la opción *TF positivos* y *TF negativos* se obtiene el espectro 2D de UF-NMR a partir de los datos registrados durante los gradientes positivos y negativos respectivamente (figura 1.9).

Los espectros se muestran en modo magnitud como curvas de nivel de intensidad. Es posible modificar el umbral y el número de niveles representados mediante las barras de desplazamiento (*sliders*) situadas a la derecha de la ventana del espectro (figura 1.9).

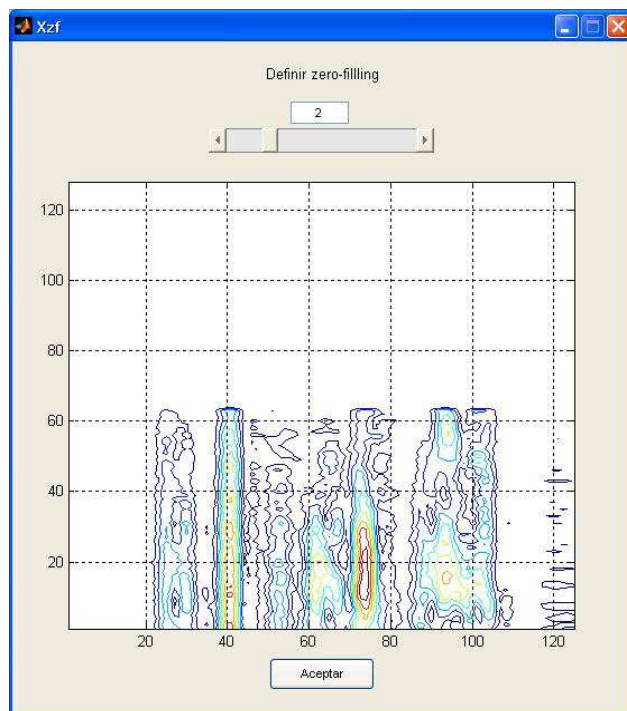


Figura 1.10. Ventana de la utilidad del llenado con ceros en la dirección t_2 .

Previo a la obtención de los espectros es posible realizar un procesamiento de los datos que mejoran la resolución y la relación señal/ruido. El primer paso para ello consistiría en aumentar la resolución en la dirección F_2 mediante la realización del llenado con ceros¹⁰⁶ en esta dirección. En este proceso se añaden ceros al final de los datos adquiridos, con lo que se aumenta la resolución espectral en esta dirección (figura 1.10).

El siguiente paso a realizar se denomina *shearing*¹⁰⁷ y permite alinear verticalmente las filas del espectro antes de aplicar la transformada de Fourier. En algunos casos y, debido a imperfecciones en los gradientes, concretamente, cuando la intensidad de los gradientes positivos no es exactamente la misma que la intensidad de los gradientes negativos, las filas individuales de la matriz de los datos adquiridos no se encuentran perfectamente alineadas (figura 1.11).

¹⁰⁶ Keeler, J. *Understanding NMR Spectroscopy*; Wiley: Chichester, 2005.

¹⁰⁷ El término *shearing* proviene del inglés y se refiere a la tensión por cizalladura de algunos materiales en los que una capa del material se desliza sobre otra.

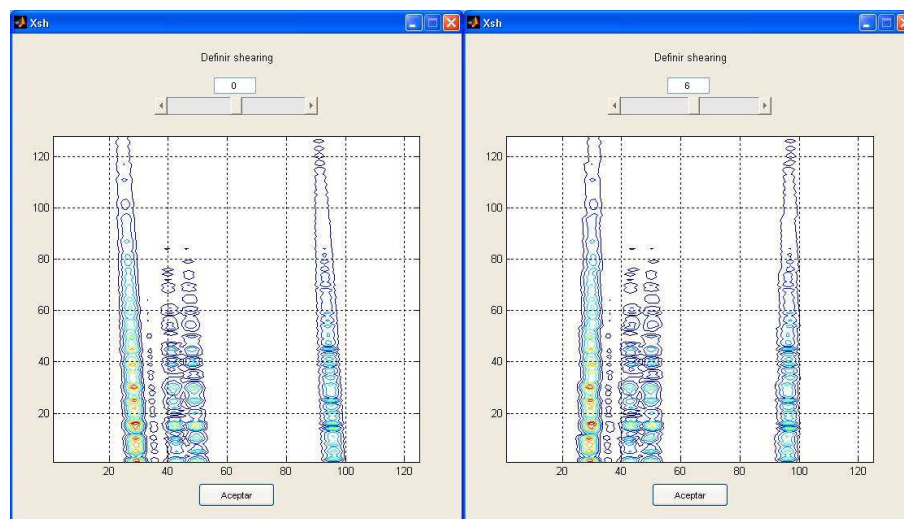


Figura 1.11. A la izquierda de la figura se muestra la ventana de la utilidad de corrección por *shearing* anterior al ajuste. A la derecha se muestra la ventana con los datos corregidos.

Mediante las opciones *TF positivos* y *TF negativos* se muestran respectivamente los espectros procedentes de los datos adquiridos durante los gradientes positivos y durante los negativos. Como se indicó en la introducción, estos espectros son muy parecidos, por lo que es posible sumarlos para obtener un espectro con una relación S/R superior. Ambos espectros solamente se diferencian por un pequeño desplazamiento, que es necesario corregir para poder sumarlos. Mediante el programa XprocSS es posible superponer ambos espectros y realizar esta corrección de forma interactiva (figura 1.12). Una vez realizada, el espectro suma se muestra en la ventana al seleccionar la opción *TF suma* (figura 1.6).

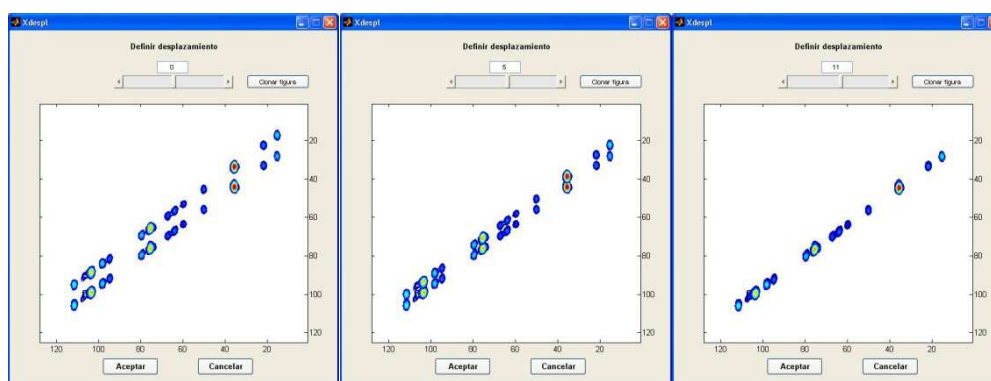


Figura 1.12. Ventana de corrección del desplazamiento entre los espectros obtenidos a partir de los datos adquiridos mediante los gradientes positivos y negativos. A la izquierda se muestra la ventana con la superposición de los espectros anterior a la corrección. En el centro se muestran los mismos espectros cuando la corrección no está finalizada. A la derecha ésta se ha terminado y ambos espectros coinciden. La corrección se realiza de forma interactiva mediante la barra de desplazamiento de la parte superior de la ventana.

1.3. Adquisición del experimento de RMN ultrarrápido

En este apartado se aborda la adquisición del experimento de UF-NMR. Para ello el primer paso consiste en la determinación de los parámetros de adquisición del experimento. Para ilustrar el modo de trabajo se ha supuesto que se trabaja en un

espectrómetro de 500 MHz empleando la molécula de la estricnina como patrón para la adquisición de un experimento homonuclear. En otros casos los pasos a seguir serían similares.

Se han seleccionado anchuras espectrales, SW_1 y SW_2 , de 4 ppm. Utilizando el programa *paramadq* se determinan los valores de los gradientes y pulsos que permiten obtener estas ventanas (figura 1.13).

Yellow Section (Basic Parameters)	
Frecuencia del espectrómetro (MHz):	500
Nucleo:	1H
Gradiente maximo (G/cm):	53.5
Longitud de la sonda (cm):	1.8

Green Section (Excitation Parameters)	
Gradiente de excitacion (%):	14
Ancho de banda del pulso adiabatico (KHz):	60
Z efectivo / Z maximo:	1.0471

Cyan Section (Acquisition Parameters)	
Anchura espectral en F2 (ppm):	4.00
Longitud del pulso adiabatico (ms):	10.0
rise time (us):	40
Gradiente de adquisicion (%):	44.5
Tiempo de adquisicion (us):	210
Anchura espectral en F1 (ppm):	4.005

Calcular

Figura 1.13. Parámetros de adquisición para obtener anchuras espectrales SW_1 y SW_2 iguales a 4 ppm.

La frecuencia del espectrómetro empleado en este caso sería 500 MHz. Se selecciona el núcleo ^1H ya que el experimento básico se trata de un experimento homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$. El gradiente máximo alcanzable por la sonda utilizada sería 53.5 G/cm, y la longitud de dicha sonda 1.8 cm.

Se selecciona un pulso *chirp* de ancho de banda de 60 kHz y un gradiente aplicado durante dichos pulsos del 14% del gradiente máximo. Esto da como resultado que la relación entre la longitud real excitada por el pulso *chirp* y el gradiente y la longitud de la sonda sea aproximadamente 1, lo que significa que se está excitando la mayor longitud de la muestra posible.

Para obtener una anchura espectral SW_2 de 4 ppm es necesario que el gradiente durante la adquisición se aplique durante 250 μs . Si tenemos en cuenta que en el espectrómetro empleado y con la sonda de RF utilizada se necesitarían 40 μs para que el gradiente aplicado se “apague” completamente (*rise time*) el tiempo que tendrá que estar aplicado cada gradiente durante la adquisición, *Tiempo de adquisición*, es de 210 μs .

Una vez seleccionados estos parámetros se determina el tiempo de aplicación para el pulso *chirp* o tiempo de excitación y un gradiente de adquisición adecuados para obtener una anchura espectral en F1 lo más cercana a 4 ppm. En este caso se selecciona

un tiempo de excitación de 10 ms y un gradiente de adquisición del 44.5% del gradiente máximo.

Estos valores son “*trasladados*” a los parámetros de adquisición de la secuencia programada en el programa TOPSPIN del siguiente modo:

- El valor del gradiente de excitación con valor positivo corresponde a la variable GPZ(1) y con valor negativo a la variable GPZ(2).
- El valor del gradiente de adquisición con valor positivo corresponde a la variable GPZ(3) y con valor negativo a la variable GPZ(4).
- La longitud del pulso adiabático o tiempo de excitación, expresada en μs , correspondería a la variable P(11).
- El Tiempo de adquisición, expresado en μs , corresponde a la variable P(13).
- El tiempo de estabilización del gradiente o *rise time*, expresado en ms, corresponde a la variable D(16).
- El ancho de banda del pulso *chirp* está programada en la forma del pulso que corresponde a la variable SPNAM(1).

Además de estas variables es necesario definir otros parámetros necesarios para la realización del experimento, como son:

- DW, o dwell time, expresado en μs , es el tiempo de muestreo entre datos y define el número de puntos que se adquieren en cada gradiente de adquisición. En todos los experimentos presentados en este trabajo se ha definido como 1 μs .
- L(4) que establece el número de repeticiones del gradiente bipolar durante la adquisición. Para el experimento aquí presentado se ha definido en 64.
- SPOFFS(1) define el offset inicial, en Hz, de la frecuencia barrida por el pulso adiabático *chirp* de la codificación (k, v_1) . Este valor dependerá de la ventana de adquisición en F1. Para el caso de un experimento homonuclear de la estricnina la ventana seleccionada estaría comprendida entre 0.5 y 4.5 ppm. EL modo para calcuñar este valor se describe en la [sección VI.1](#).
- GPNAM(3) y GPNAM(4) definen la forma de los gradientes durante la adquisición. En todos los casos presentados en este trabajo se han definido gradientes rectangulares.
- P(16), GPZ(16) y GPNAM(16) definen respectivamente la duración en microsegundos, la intensidad, en % del valor máximo, y la forma del gradiente de purga previo a la adquisición. Estos valores dependen del espectrómetro y la sonda utilizada. Para el caso del experimento homonuclear a 500 MHz con una sonda BBO, se ha aplicado un gradiente sinusoidal de intensidad 25% del gradiente máximo durante 200 μs .

Una vez calculados los parámetros de adquisición propios de la secuencia e incorporados éstos a la lista de parámetros del experimento, es necesario añadir algunos parámetros comunes a los experimentos tradicionales y a los experimentos ultrarrápidos, como son el tiempo y la potencia del pulso duro de 90° de ^1H , el número de *scans*, el tiempo de repetición de la secuencia, etc.

Es importante mencionar que para los experimentos adquiridos en el espectrómetro de 500 MHz empleado, el modo de digitalización se ha definido en modo *analógico*. Ello permite obtener algunas ventajas, como son: controlar el ancho de banda

del filtro analógico, definir un tiempo de muestreo (*dwell time*) menor a 5 μ s; además, en este caso, no se introducen puntos nulos al inicio de los datos sin transformar.

Una vez definidos todos los parámetros necesarios se puede adquirir el experimento. Para el caso de las secuencias de pulsos no dinámicas desarrolladas en esta Tesis, los datos se adquieren como los de los experimentos tradicionales monodimensionales. El programa de procesamiento XprocSS puede leer directamente el fichero de datos, ordenarlos y separarlos para realizar la transformada de Fourier a lo largo de la dirección t_2 , como se ha comentado en el apartado anterior.

1.4. El experimento básico de UF-NMR

El experimento básico de UF-NMR consiste en un experimento en el que no existe etapa de mezcla, cuyo esquema es el que se muestra en la figura 1.2. Se ha escrito el programa de pulsos para la realización de la secuencia básica de RMN 2D ultrarrápida de correlación homonuclear. El listado de este programa, [ufdiag.ucm](#), se ha incluido en el Apéndice A.

Como se ha comentado con anterioridad, el experimento básico de UF-NMR consiste en la obtención en un único barrido de un espectro 2D homonuclear en el que no se codifica tipo de correlación alguna. Simplemente se obtiene la diagonal del experimento homonuclear tradicional.

Utilizando el programa de pulsos *ssdiag.ucm*, los parámetros mencionados en el apartado anterior y el programa de procesamiento XprocSS, se obtiene el espectro básico UF-NMR (figura 1.14). El espectro que se muestra en la figura se ha obtenido en un equipo de 500 MHz. Los parámetros de adquisición utilizados son los que se han enumerado en el apartado anterior. El tiempo total de adquisición del experimento fue de 0.052 s.

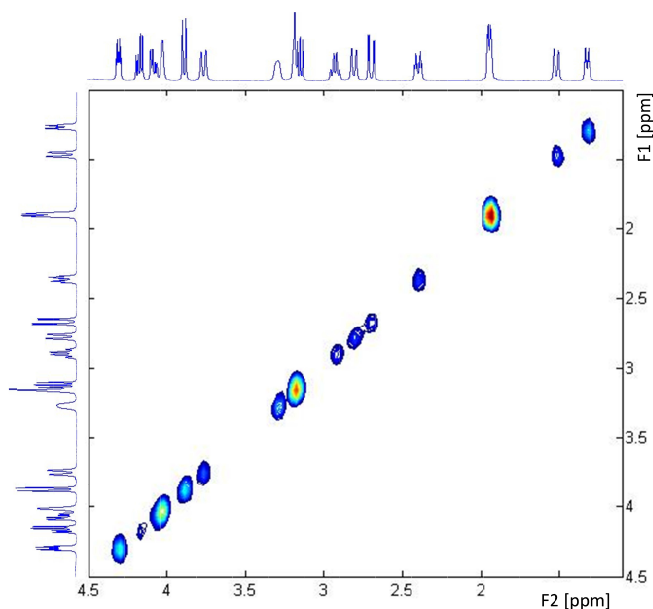


Figura 1.14. Experimento UF-NMR básico de la estricnina. El espectro se ha adquirido en un espectrómetro de 500 MHz con una muestra de estricnina 100 mM en CDCl_3 y empleando una sonda BBO (parámetros de adquisición y procesamiento descritos en el texto y en el [apartado VI.2](#)).

Previo a la transformada de Fourier se ha realizado un llenado con ceros de la dirección t_2 en un factor 2; es decir, se ha añadido el mismo número de ceros que puntos posee el espectro en esa dirección. En este caso no ha sido necesario corregir las desviaciones de los gradientes mediante el *shearing*, ya que el desequilibrio entre los gradientes positivos y negativos de la decodificación ha sido corregido durante la adquisición. Para ello se ha definido el gradiente negativo un 0.01% más intenso que su correspondiente gradiente positivo. El espectro que se muestra corresponde al obtenido con los datos adquiridos mediante los gradientes positivos.

En la obtención del espectro básico de UF-NMR en un equipo de 700 MHz, dotado con una criosonda TCI, se han seguido pasos análogos, empleando una muestra de estricnina 40 mM en CDCl_3 . Dicho espectro se muestra en la figura 1.15. El tiempo total de adquisición fue de 0.033 s.

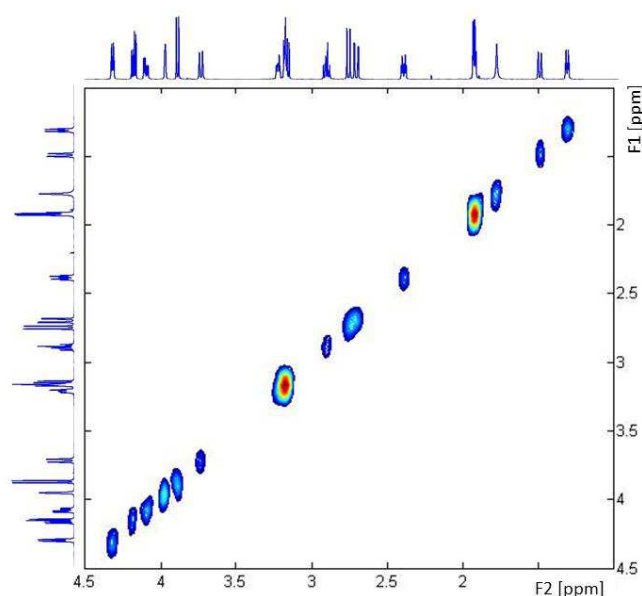


Figura 1.15. Espectro UF-NMR básico de la estricnina en CDCl_3 a 700 MHz.

Para la adquisición del espectro se ha programado una secuencia de codificación espacial modulada en amplitud (figura 1.2). Las anchuras espectrales fueron 4 ppm en la dirección directa y 4.25 ppm en la dirección indirecta. Los parámetros experimentales de la adquisición y el procesado se han incluido en el [apartado VI.2](#).

El modo de digitalización empleado en esta consola AVIII se ha definido como *digital* por tres razones fundamentales. En primer lugar, incluso cuando se define el modo de digitalización analógico, no es posible tener control sobre el ancho de banda del filtro. En segundo lugar, el tiempo de muestreo en este tipo de consola puede ser igual al valor deseado y llegar hasta 0.05 μs como límite inferior. Por último, el modo de programación para adquirir datos en modo analógico en esta consola depende específicamente de ella, por lo que no sería posible instalar el programa de pulsos en otra sin hacer modificaciones. En este tipo de digitalización el programa TOPSPIN realiza un filtrado digital de los datos. Este tipo de filtros introduce puntos nulos en los datos adquiridos que deben ser excluidos de forma previa al procesado.

1.5. Estrategias metodológicas

Como se ha comentado en la introducción, es posible conseguir la codificación espacial a través de diferentes esquemas. En el desarrollo de esta Tesis se han explorado diferentes posibilidades como son:

- El **esquema modulado en amplitud** (figuras II.24 y 1.2), que hace uso de pulsos *chirp* de excitación para codificar y almacenar las frecuencias del dominio indirecto. Este esquema es el que se ha utilizado principalmente por ser con el que más fácilmente se ajustan todos los parámetros y el que necesita valores del gradiente de adquisición menores, siempre y cuando la S/R no sea el factor limitante.
- El **esquema de tiempo constante** (figura II.24), que emplea pulsos *chirp* de 180°. Este esquema se ha utilizado en los casos en los que la secuencia está modulada en fase, como en el caso de la secuencia COSY, también en aquellos casos en los que es necesaria una mayor resolución en el dominio indirecto (figura 1.16) y en los casos en los que la S/R era el factor limitante. Para este esquema se debe tener en cuenta que los parámetros, principalmente la intensidad y el offset del pulso *chirp*, se ajustan con mayor dificultad que en el caso del esquema modulado en amplitud. Por otro lado necesita intensidades de gradientes superiores, lo que podría producir pérdidas debidas a la difusión. Además, y debido a que la magnetización permanece mayor tiempo en el plano transversal, puede haber pérdidas debidas a la relajación transversal.
- También se ha probado el **esquema modulado en fase**¹⁰⁸ que utiliza un pulso *chirp* de 90° para generar la codificación espacial y un pulso *chirp* de 180° para almacenar dicha codificación. En todos los casos este esquema produce una pérdida de resolución en el dominio indirecto, a pesar de que la S/R es superior comparado con el esquema modulado en amplitud.
- Por último se ha programado la **secuencia first in first out**¹⁰⁹ **modulada en amplitud** que emplea pulsos *chirp* de 90° para codificar y almacenar las frecuencias pero en la que los pulsos emplean barridos opuestos. De este modo se consigue que la magnetización permanezca en el plano transversal el mismo tiempo para todas las posiciones de la muestra, dando lugar a formas de línea puras en absorción. En todos los casos se encontró una pérdida de resolución en la dirección F1 (figura 1.16).

En la figura 1.16 se muestran diferentes ejemplos de los espectros básicos obtenidos aplicando las secuencias anteriores. En el esquema de tiempo constante (B) se observa un aumento de la resolución en la dirección indirecta a pesar de que se ha utilizado un tiempo de codificación inferior ($T_e=5\text{ms}$) respecto del esquema modulado en amplitud (A, $T_e=10\text{ ms}$). Esta disminución en el tiempo de codificación se debe a que para el mismo valor de codificación, el esquema de tiempo constante emplea un gradiente de adquisición que es el doble del usado en el esquema modulado en amplitud, lo que llevaría a valores de gradiente muy intensos (del orden del 90% o superiores) para la anchura espectral empleada en estos ejemplos ($\text{SW}_1=4\text{ ppm}$). En los esquemas modulados en amplitud *first-in-first-out* se observa una pérdida de resolución respecto a los esquemas modulados en amplitud y de tiempo constante. Estos experimentos además presentan la dificultad de tener que ajustar independientemente el *offset* de los

¹⁰⁸ Anderser, N. S.; Köckenberger, W. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, 43, 795-797.

¹⁰⁹ Shrot, Y.; Tal, A.; Frydman, L. *Magn. Reson. Chem.* **2009**, 47, 415-422.

dos pulsos *chirp* de excitación. Los parámetros de adquisición de los espectros se detallan en el [apartado VI.2](#). Los tiempos de adquisición para estos espectros fueron de 0.052 s para el espectro en (A), de 0.042 s para el espectro mostrado en (B) y 0.057 s para el espectro en (C).

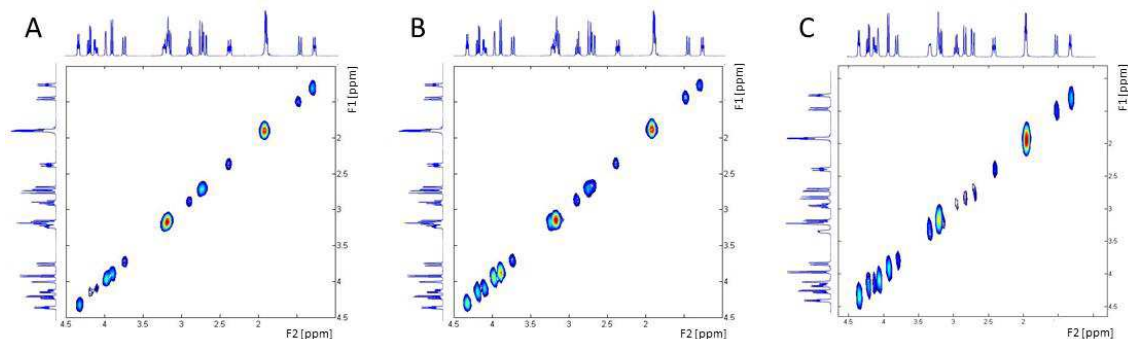


Figura 1.16. Espectros básicos de UF-NMR obtenidos empleando 3 esquemas de codificación diferentes. (A) esquema modulado en amplitud. (B) esquema de tiempo constante. (C) Esquema modulado en amplitud *first-in-first-out*.

En los espectros adquiridos mediante el esquema modulado en fase se observa un aumento de la relación S/R respecto al experimento modulado en amplitud y comparable a la del experimento de tiempo constante. Sin embargo, estos experimentos suponen una pérdida de la resolución en el dominio indirecto. Por esta razón este esquema no se ha empleado en los experimentos presentados en esta Tesis doctoral.

Debido a esto en el desarrollo de esta Tesis se han empleado secuencias de UF-NMR basadas en el esquema modulado en amplitud y en el esquema de tiempo constante.

Como se ha visto las anchuras espectrales SW_1 y SW_2 dependen de diferentes parámetros experimentales (1.3 y 1.4). Se ha estudiado el efecto que éstos tienen sobre dichas anchuras espectrales y sobre la resolución del espectro UF-NMR.

La resolución del espectro en el dominio indirecto, t_1 , depende del tiempo de la codificación espacial, T_e (tabla II.1). Un mayor tiempo de codificación da lugar a una mejor resolución, pero valores superiores de T_e reducen el valor de SW_1 . Para mantener el valor de la anchura espectral es necesario aumentar el valor del gradiente de decodificación, G_a , lo que podría llevar a valores que comprometan la seguridad de la sonda, sobre todo en los casos de la secuencia de tiempo constante, que emplean valores superiores de este gradiente. Además, valores superiores de este gradiente pueden producir pérdidas de la señal por difusión. Una posible solución sería el aumento del valor del tiempo de adquisición, T_a . Sin embargo, esto daría lugar a una disminución del valor de la anchura espectral en el dominio directo, SW_2 .

En la figura 1.17 se muestra el efecto que el aumento del tiempo de codificación espacial tiene sobre el espectro. En este caso se han representado los datos antes de la realización de la transformada de Fourier respecto a t_2 por ser más evidente el efecto que este parámetro tiene sobre el espectro de UF-NMR. En todos los casos el ancho de banda del pulso *chirp* fue de 60 kHz. En (A) la duración del pulso es de 5ms, en (B) 10 ms y en (C) 20 ms. En cada caso, y para mantener el valor de la anchura espectral en el dominio indirecto SW_1 en 4 ppm, ha sido necesario aumentar el gradiente de adquisición. En (A) $G_a=13.375$ G/cm, en (B) $G_a=25.68$ G/cm y (C) $G_a=48.15$ G/cm. Se puede observar que valores mayores del tiempo de codificación dan lugar a una mayor resolución en el dominio indirecto, aunque también implican valores mayores del gradiente de adquisición, lo que produce una pérdida de señal (el máximo de la intensidad de la señal para el mismo valor de la ganancia del receptor para cada experimento fue: (A) $2.6e+04$; (B) $1.1e+04$; (C) $5.5e+03$). Es importante observar que valores mayores de este gradiente también producen distorsiones de la señal de resonancia. Los tiempos de adquisición de los espectros fue de: (A) 0.042 s, (B) 0.052 s y (C) 0.072 s.

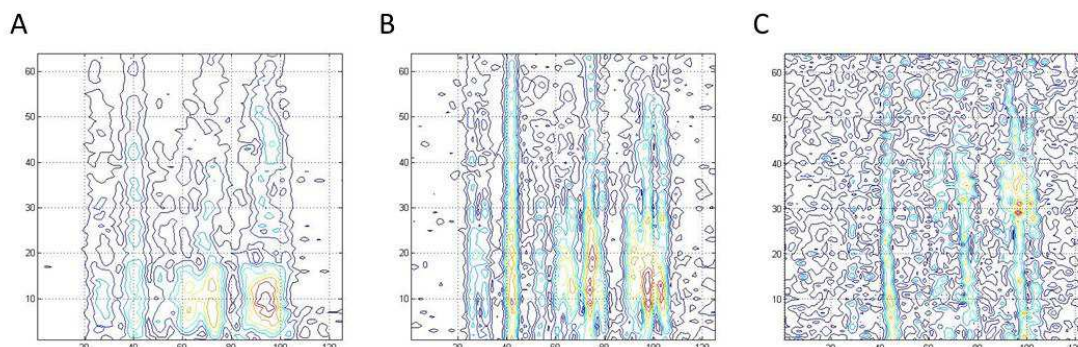


Figura 1.17 Datos de UF-NMR anteriores a la realización de la transformada de Fourier respecto a t_2 para diferentes valores del tiempo de codificación. (A) $T_e=5$ ms. (B) $T_e=10$ ms (C) $T_e=20$ ms.

También se ha estudiado el efecto que el valor del ancho de banda del pulso *chirp* tiene sobre el espectro mientras los demás parámetros permanecen constantes (figura 1.18). Como podemos observar al aumentar el ancho de banda del pulso *chirp* se produce un aumento de la anchura espectral de la dimensión indirecta SW_1 . Ambos espectros se adquirieron en 0.033 s.

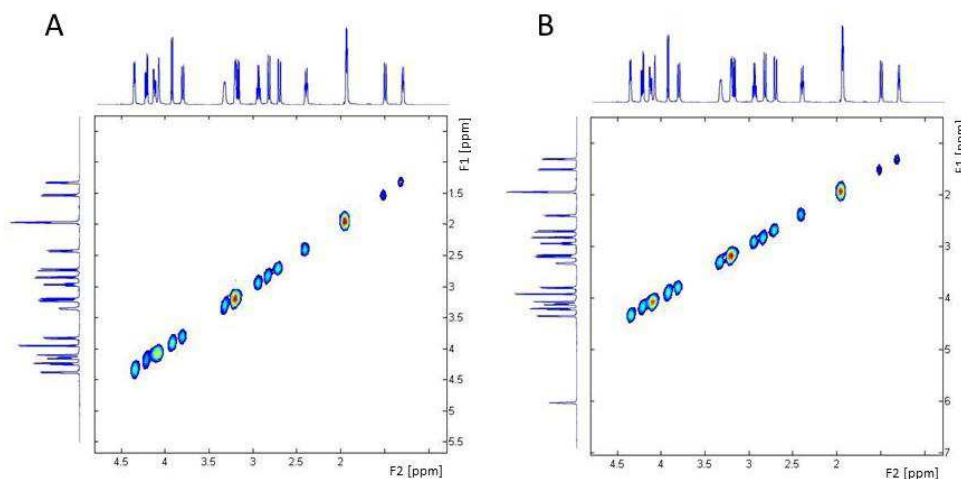


Figura 1.18. Espectros básicos de UF-NMR adquiridos con diferentes anchos de bandas del pulso *chirp*. (A) $\Delta\Omega_{RF}=50$ kHz y (B) $\Delta\Omega_{RF}=60$ kHz.

Los parámetros experimentales de los espectros de las [figuras 1.17 y 1.18](#) se detallan en el apartado VI.2.

Es posible aumentar la resolución en el dominio directo sin modificar la anchura espectral, SW_2 , aumentando el número de puntos en esta dirección, N_2 . Ello podría conducir a que, cuando el gradiente de adquisición, G_a , sea intenso, aumenten las pérdidas por difusión e incluso la temperatura de la sonda. Se ha comprobado que mantener el número de puntos en un valor conservador, por ejemplo 64, y aumentar la resolución mediante el procesamiento posterior de la señal a través del llenado con ceros o la predicción lineal produce un espectro de calidad similar al que se obtiene aumentando el número de puntos (figura 1.19).

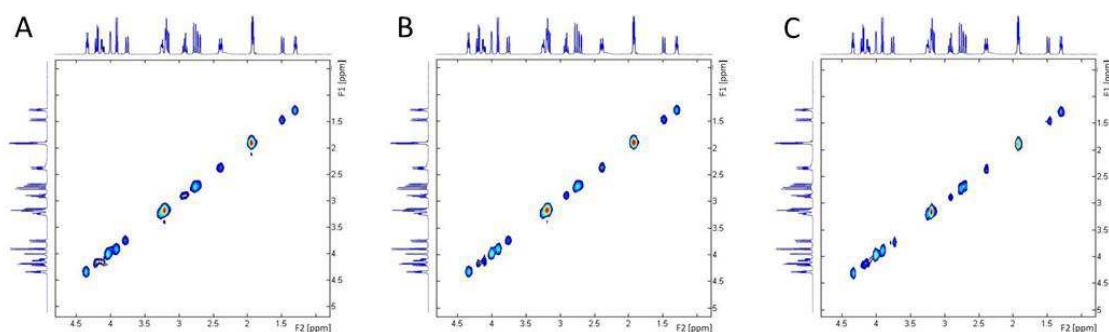


Figura 1.19. Efecto del aumento del valor de N_2 sobre el espectro de UF-NMR (A) $N_2=64$ y no se ha realizado llenado con ceros. (B) El mismo espectro que (A) pero se ha realizado un llenado con ceros en un factor 2. El tiempo de adquisición del espectro fue de 0.052 s. (C) $N_2=128$ y no se ha realizado llenado con ceros. Este espectro se adquirió en 0.084 s. Los parámetros de adquisición de ambos experimentos se describen en el [apartado VI.2](#).

Por último, se ha estudiado el efecto que modificar el tiempo de decodificación, T_a , tiene sobre el espectro (figura 1.20). Se observa que el aumento de este tiempo origina una disminución de la anchura espectral.

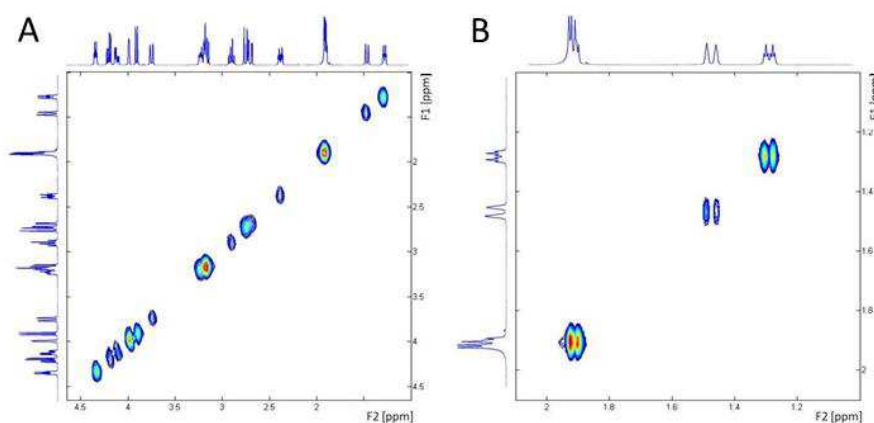


Figura 1.20. Espectros ultrarrápidos básicos de tiempo constante obtenidos con diferentes tiempos de adquisición, (A) $T_a=250 \mu s$. (B) $T_a=1000 \mu s$. El efecto de cuadruplicar el tiempo de adquisición es la disminución de la anchura espectral, SW_2 en un factor 4. (A) $SW_2=4$ ppm. (B) $SW_2=1$ ppm. El tiempo de adquisición fue de 0.042 s para el espectro en (A) y 0.148 s para el espectro en (B). Los parámetros de adquisición de ambos experimentos se detallan en el [apartado VI.2](#).

En resumen, en el Capítulo 1 se ha abordado la realización del experimento básico de *RMN ultrarrápida* (experimento diagonal). Ello ha implicado los siguientes aspectos concretos:

- Desarrollo de un programa interactivo para el cálculo de los parámetros de adquisición de los experimentos de *RMN ultrarrápida*. Este programa es independiente del equipo de resonancia, del programa de adquisición y del ordenador empleado. Se ha escrito en el lenguaje de programación *Matlab* que es compatible con diferentes plataformas. Los parámetros de adquisición así calculados se pueden “trasladar” fácilmente a la lista de parámetros de adquisición de cada sistema.
- Un nuevo programa para la obtención del espectro *ultrarrápido* a partir de los parámetros de adquisición calculados, puesto que esta operación no puede realizarse del mismo modo que en los espectros tradicionales. El programa permite además el procesado de los datos para la optimización de dicho espectro y puede ejecutarse en cualquier estación de trabajo independientemente del espectrómetro en el que se hayan adquirido los datos.
- Se ha generado el programa de pulsos para la realización del experimento básico 2D de *RMN ultrarrápida* y se ha aplicado con éxito para espectrómetros de 500 MHz con un equipamiento estándar y de 700 MHz con una criosonda TCI.
- Se han estudiado diferentes secuencias para la codificación espacial, modulada en amplitud, de tiempo constante, modulada en fase y modulada en amplitud *first-in-first-out*, y los parámetros de dichas esquemas, estableciéndose las condiciones óptimas de aplicación para cada uno de ellos.

CAPÍTULO 2: SECUENCIAS PARA LA MONITORIZACIÓN DEL ACOPLAMIENTO ESCALAR

El presente capítulo aborda la adquisición de experimentos de correlación escalar homo y heteronuclear mediante técnicas de RMN ultrarrápida y su aplicación al estudio de sistemas dinámicos en tiempo real.

2.1. Monitorización del acoplamiento escalar homonuclear

2.1.1. Codificación modulada en amplitud

2.1.1.1 UF-TOCSY

El espectro de correlación homonuclear TOCSY ultrarrápido puede obtenerse usando como base la secuencia básica modulada en amplitud presentada en el capítulo anterior (figura 1.2), a la que, tras la etapa de codificación espacial, se le añade una etapa de mezcla como se muestra en la figura 2.1. Esta etapa consiste en una secuencia de bloqueo de espines (*spin-lock*) durante la cual se conserva la codificación de ν_1 .

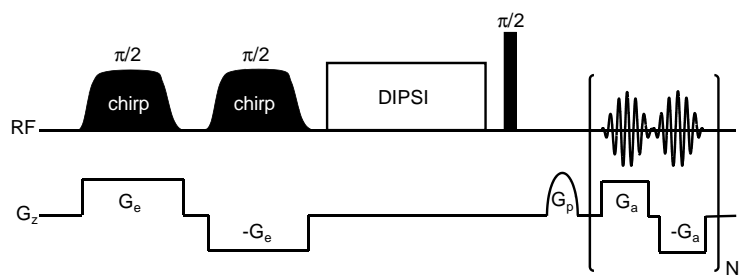


Figura 2.1: Esquema de la secuencia de UF-TOCSY modulada en amplitud.

La secuencia usa dos pulsos $\pi/2$ *chirp* para la excitación y almacenamiento espacialmente selectivo lo que permite obtener una codificación (k/ν_1) que se modula según la amplitud de la magnetización. Seguidamente se aplica la etapa de mezcla. En la figura 2.1 se ha representado una secuencia tipo DIPSI, aunque existe la posibilidad de emplear otras secuencias. Tras la etapa de mezcla se aplica un pulso duro de 90° que devuelve la magnetización al plano transversal para ser medida mediante una secuencia EPSI.

El programa de pulsos ([uftocsy.ucm](#)) para la secuencia UF-TOCSY utilizada en un espectrómetro Bruker AV500 se ha incluido en el Anexo A.

En la figura 2.2 se muestran los experimentos UF-TOCSY (A) y TOCSY tradicional (B) de una muestra de estricnina en CDCl_3 70 mM a 500 MHz. Los parámetros de ambos experimentos se han incluido en el [apartado VI.3.1](#). Las anchuras espectrales del experimento UF-TOCSY fueron $\text{SW}_1=5.3$ ppm y $\text{SW}_2=4$ ppm y el tiempo total de la adquisición fue de 0.164 s. El tiempo total de adquisición del experimento TOCSY tradicional fue de 2 h 16 min y las anchuras espectrales $\text{SW}_1=10$ ppm y $\text{SW}_2=10$ ppm.

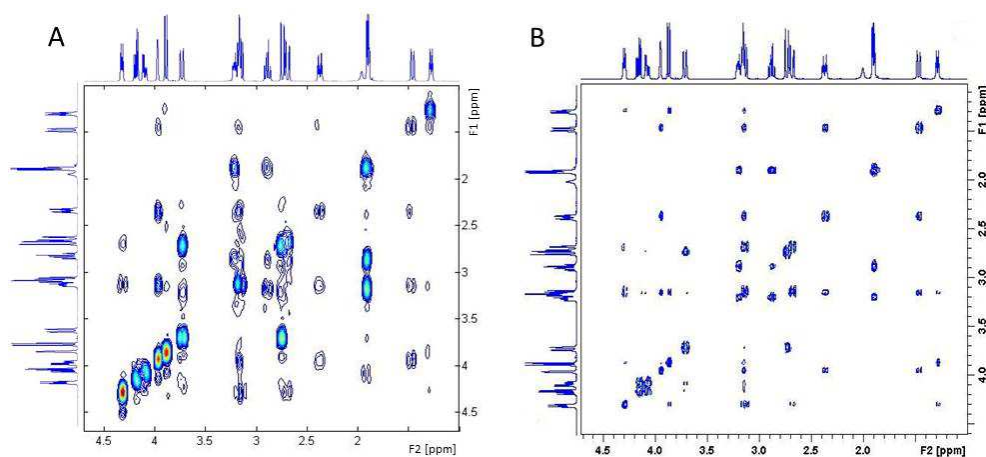


Figura 2.2: Espectro UF-TOCSY (A) y espectro TOCSY tradicional (B) de una muestra de estricnina a 500 MHz.

A pesar de la diferencia en las anchuras espectrales entre ambos experimentos, que como podemos observar es mucho menor en el caso del experimento de RMN ultrarrápida, se puede apreciar la gran diferencia en el tiempo total de adquisición entre ambos experimentos.

La secuencia 2D UF-TOCSY también se ha implementado en un espectrómetro de 700 MHz empleando una criosonda TCI. Los espectros UF-TOCSY y TOCSY tradicional se muestran en la figura 2.3. Los parámetros de adquisición de ambos experimentos pueden consultarse en el [apartado VI.3.1](#). El tiempo de adquisición del experimento UF-TOCSY fue de 0.123 s y del TOCSY tradicional 1 h 6 min.

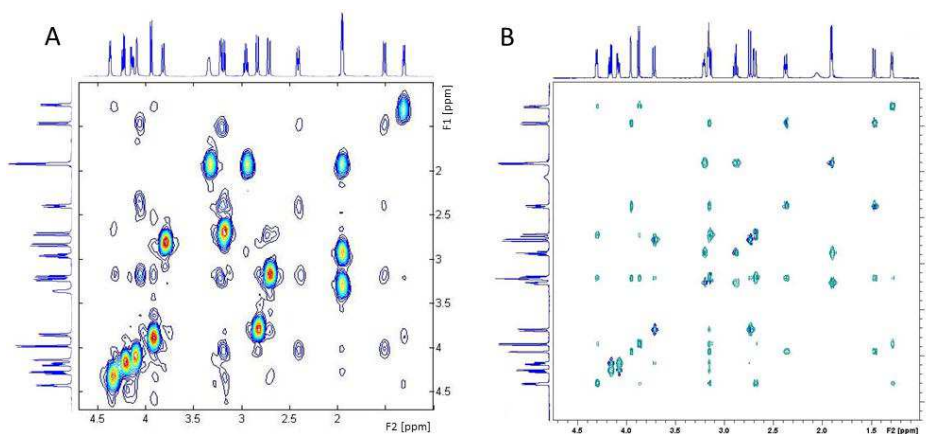


Figura 2.3: (A) Espectro UF-TOCSY de una muestra de estricnina 100 mM en CDCl_3 . (B) Espectro TOCSY tradicional de una muestra 20 mM en CDCl_3 . A 700 MHz

Utilizando la secuencia 2D UF-TOCSY y una muestra de estricnina se ha realizado un estudio de la concentración mínima necesaria para obtener un espectro UF TOCSY 2D con anchuras espectrales $SW_1 = 4 \text{ ppm}$ y $SW_2 = 4 \text{ ppm}$ a 500 y a 700 MHz. En este último caso se usó una criosonda. Los resultados se muestran en la tabla 2.1.

Espectrómetro (MHz)	Sonda	Concentración mínima (mM)
500	TBI	40
500	BBO	40
700	Criosonda	20

Tabla 2.1: Concentraciones mínimas para el experimento UF-TOCSY realizado en un único *scan* con una muestra de estricnina en CDCl_3 .

Los valores mostrados en la tabla 2.1 son los valores mínimos para obtener un espectro UF-TOCSY en un único *scan*. En todos los casos se han sumado los espectros obtenidos durante los gradientes positivos y negativos de la secuencia EPSI para aumentar así la S/R del espectro. Cuando la intensidad de la señal no es suficientemente alta, es posible aumentarla mediante la acumulación de varios *scans*. Esto aumentaría lógicamente el tiempo de adquisición del experimento UF-TOCSY. Sin embargo, como el tiempo de adquisición son tan pequeños todavía seguiría siendo varios órdenes de magnitud menor que el tiempo necesario para el espectro tradicional¹¹⁰. Los parámetros de adquisición se han incluido en el [apartado VI.3.1](#).

2.1.1.2. UF-COSY

Empleando la secuencia modulada en amplitud mostrada en la figura 2.1 de la sección anterior, es posible obtener un espectro UF-COSY ajustando simplemente el tiempo de mezcla de la secuencia. Así, para la obtención de un espectro de correlación homonuclear UF-COSY se han usado tiempos de mezcla inferiores a 20 ms.

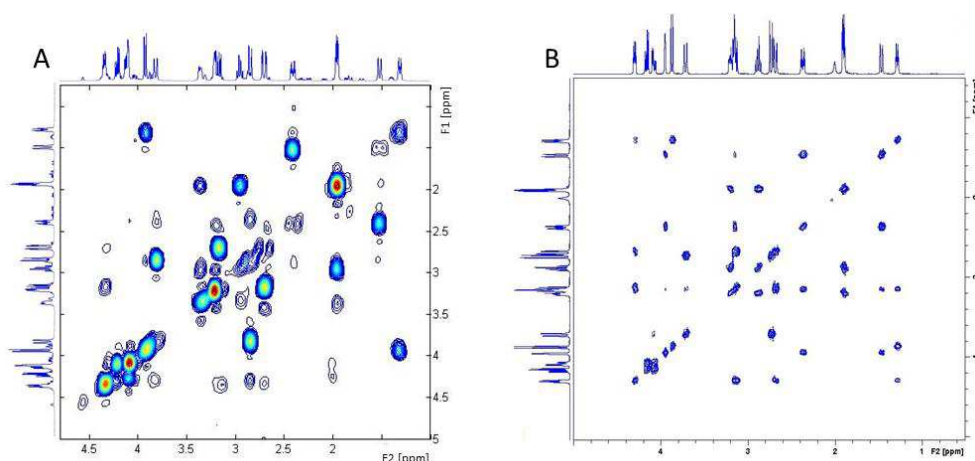


Figura 2.4: (A) Experimento UF-COSY modulado en amplitud y (B) COSY tradicional a 500 MHz.

¹¹⁰ El experimento UF-TOCSY de un único *scan* tiene una duración aproximada entre 150 ms y 200 ms. En el caso de experimentos con 2 *scans* es necesario esperar un tiempo suficiente entre ambos *scans* para la completa relajación de la magnetización. En nuestro caso se ha seleccionado un tiempo de 10 s. Este tiempo es además suficiente para evitar que la continua repetición de los gradientes produzca el mal funcionamiento de los mismos o un calentamiento de la muestra. Por todo ello, el tiempo de adquisición de estos experimentos sería de 10.5 s. En el caso de experimentos de 4 *scans* el tiempo aumentaría a 50 s. El tiempo de adquisición mínimo de los experimentos tradicionales es aproximadamente de 20 min. A pesar de adquirir 4 *scans* el tiempo de realización del experimento sigue siendo muy reducido y adecuado a la escala de tiempos necesaria para la monitorización de muchos sistemas dinámicos.

En la figura 2.4 se muestran el espectro UF-COSY (figura 2.4.A) empleando una muestra de estricnina 100 mM en CDCl_3 y el experimento COSY tradicional (70 mM) adquiridos en un espectrómetro de 500 MHz. De nuevo se observa que, aunque la diferencia en las anchuras espectrales (4 ppm en ambas dimensiones para el esixperimento UF y 10 ppm para el experimento tradicional) es notable, los tiempos de adquisición varían considerablemente: 0.72 s para el experimento UF-COSY y 31 min 30 s para el experimento tradicional. Los parámetros experimentales de ambos experimentos se han incluido en el [apartado VI.3.1](#).

Los espectros de la figura 2.5 se han obtenido en un espectrómetro que opera a 700 MHz equipado con una criosonda TCI sobre una muestra de estricnina en CDCl_3 . La concentración de la muestra para el experimento UF (figura 2.5.A) fue de 100 mM y para el experimento tradicional (figura 2.5.B) 20 mM. El tiempo de adquisición del experimento UF-TOCSY fue 0.053 s y del experimento tradicional 15 min 15 s. Los parámetros de los experimentos mostrados en la figura 2.5 se describen en el [apartado VI.3.1](#).

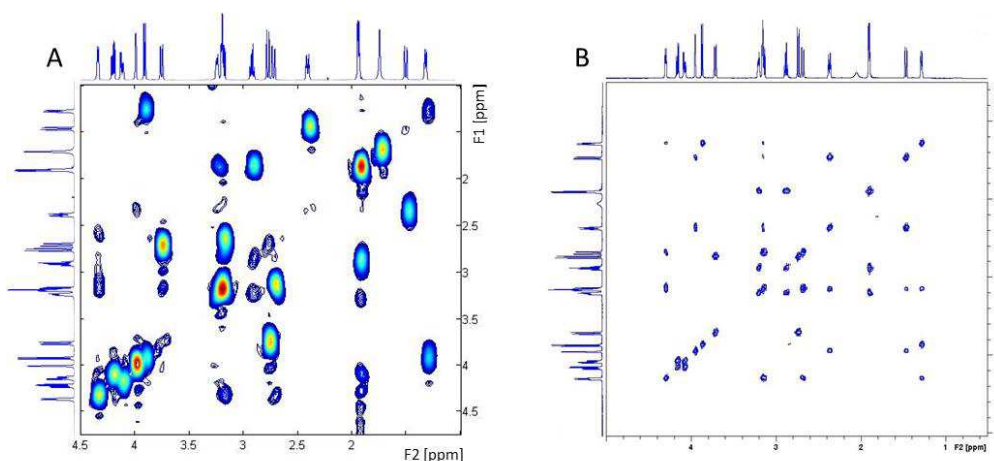


Figura 2.5: (A) Experimento UF-COSY modulados en amplitud y (B) experimento COSY tradicional registrados a 700 MHz.

En los espectros UF-COSY modulados en amplitud (figuras 2.4.A y 2.5.A) en ambos equipos se observa la usencia de algunas señales que sí están en ambos espectros tradicionales (figura 2.4.B y 2.5.B). Las señales que aparecen en los espectros UF-NMR son precisamente aquellas de los experimentos ultrarrápidos que poseen mayor intensidad. Esto se debe a que en los experimentos ultrarrápidos el número de pasos en la dirección t_1 es muy pequeña. Este valor se puede calcular a partir de los valores de la anchura y la resolución espectral en esta dimensión (ver tabla II.1 del apartado II.3.3.5). En el caso del experimento modulado N_1 es:

$$N_1 = \frac{SW_1}{\Delta\nu_1} = \frac{\gamma_a G_a T_a \Omega_{RF}}{\gamma_e G_e}$$

Para el caso del experimento UF-COSY adquirido a 500 MHz (figura 2.4.A) este valor es 48 y para el experimento a 700 MHz es 36. Estos valores son muy inferiores a 192, valor empleado en ambos experimentos tradicionales.

2.1.2. Codificación de tiempo constante

2.1.2.1 UF-TOCSY

Es posible emplear el esquema de codificación de tiempo constante (figura II.25) para la obtención de espectros de correlación escalar homonuclear. En primer lugar se ha desarrollado la secuencia UF-TOCSY de tiempo constante, cuyo esquema se muestra en la figura 2.6. En esta secuencia la codificación (k/v_1) se realiza mediante dos pulsos selectivos de 180° . El primer pulso *duro* de 90° desplaza toda la magnetización al plano transversal. A esta excitación no selectiva le sigue la aplicación de un gradiente de campo simultáneo con un pulso adiabático de reenfoque *chirp* con una rampa lineal. Tras esto se invierte el gradiente y se aplica un pulso adiabático idéntico al anterior. El efecto del primer pulso adiabático y su correspondiente gradiente de campo, es la refocalización en primer lugar de los espines en la parte inferior de la muestra y en último lugar de aquellos que se encuentran en la parte superior. Para cancelar el efecto del *offset* inducido por el gradiente, se aplica un segundo pulso adiabático *chirp* idéntico al primer pulso junto con un gradiente de sentido inverso al anterior. Ahora los gradientes de la parte superior de la muestra son reenfocados en primer lugar. El efecto total es que la evolución de los espines es proporcional a su posición en la dirección z . La secuencia continua, como en la secuencia TOCSY tradicional, con la secuencia de bloqueo de espines. La señal es entonces medida mediante la secuencia EPSI. En este caso el gradiente de purga, G_p , permite centrar el espectro y eliminar las señales no deseadas.

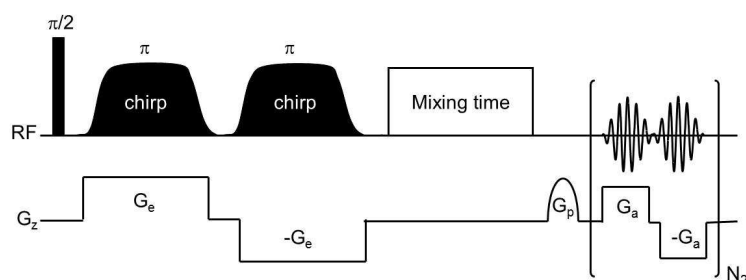


Figura 2.6. Esquema de la secuencia UF-TOCSY de tiempo constante.

Se ha programado la secuencia UF-TOCSY de tiempo constante para un equipo de 500 MHz. Dicho programa ([uftocsyCT.ucm](#)) se ha incluido en el Anexo A. El espectro UF-TOCSY de tiempo constante a 500 MHz de una muestra de estricnina 100 mM en CDCl_3 se muestra en la figura 2.7 A. EL tiempo de adquisición del experimento ha sido 0.168 s. En la figura 2.7 B se muestra el espectro TOCSY tradicional de una muestra 70 mM. El tiempo de adquisición de este experimento ha sido 31 min 30 s. Los parámetros experimentales de ambos experimentos se detallan en la [sección VI.3.2](#).

Es importante destacar el aumento de resolución que significa la secuencia de tiempo constante (figura 2.7 A) respecto a las secuencias moduladas en amplitud (figura 2.3 A), a pesar de que la primera puede verse más afectada por pérdidas debidas a la difusión y a la relajación transversal.

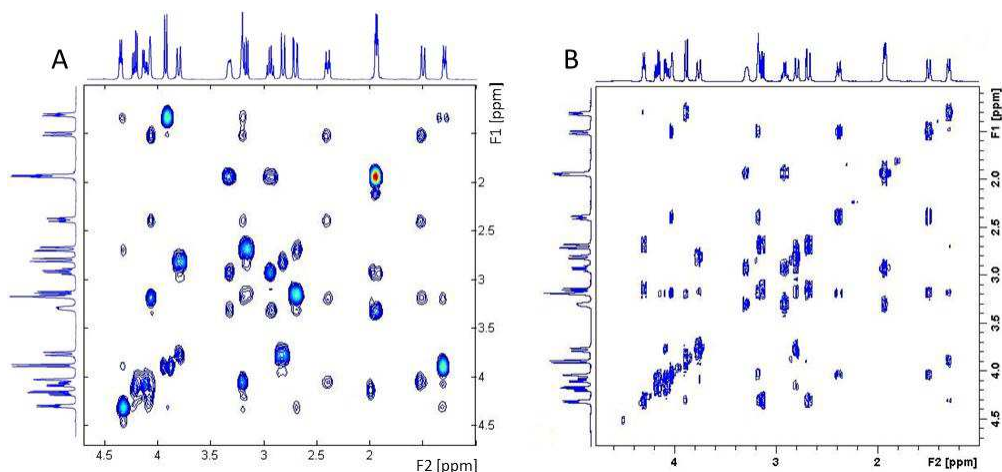


Figura 2.7. (A) Experimento UF-TOCSY de tiempo constante y (B) experimento TOCSY tradicional a 500 MHz.

Esta secuencia hace uso de pulsos *chirp* de 180° . El ajuste de la potencia y el *offset* de dichos pulsos es ligeramente diferente al ajuste realizado para los pulsos de 90° para los que la respuesta es lineal respecto a la potencia del pulso. Sin embargo los pulsos de 180° producen el reenfoque de la señal en un rango amplio de intensidades del pulso. Por ello, en los casos en los que se han utilizado las secuencias UF-NMR de tiempo constante se ha realizado previamente una calibración de los parámetros de los pulsos y del gradiente de purga mediante una secuencia básica de tiempo constante.

2.1.2.2 UF-COSY

El esquema de codificación de tiempo constante es adecuada para aquellos experimentos que están modulados en fase, como el experimento COSY. Por ello, se ha programado la secuencia UF-COSY de tiempo constante. En la figura 2.8 se muestra el esquema de dicha secuencia. El primer pulso *duro* de 90° desplaza toda la magnetización al plano transversal. A esta excitación no selectiva le sigue la aplicación del esquema de codificación de la frecuencia ν_1 de tiempo constante. La secuencia continua, como en la secuencia COSY tradicional. Finalmente la señal es medida a través de una secuencia EPSI. De nuevo, el gradiente de purga, G_p , centra el espectro y elimina las señales no deseadas.

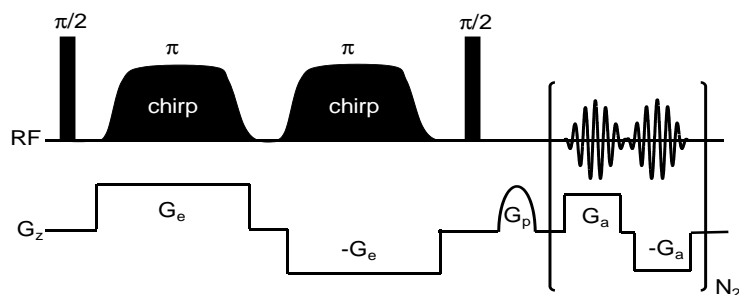


Figura 2.8. Esquema de la secuencia de UF-COSY de tiempo constante.

Se ha desarrollado asimismo el programa de pulsos para la secuencia mostrada en la figura 2.8. El listado de dicho programa de pulsos ([ufcosyCT.ucm](#)) se ha incluido en el Anexo A.

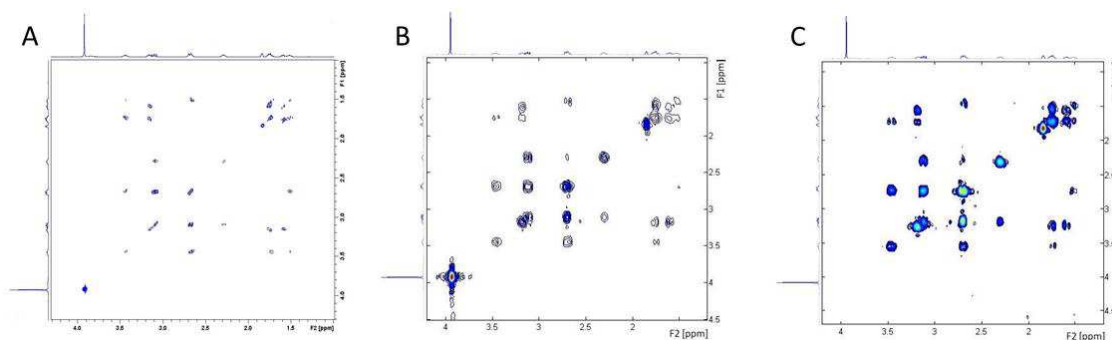


Figura 2.9. (A) Experimento tradicional. (B) Experimento UF-COSY de tiempo constante. (C) Igual que B pero se ha aplicado una presaturación de la señal a 3.917 ppm.

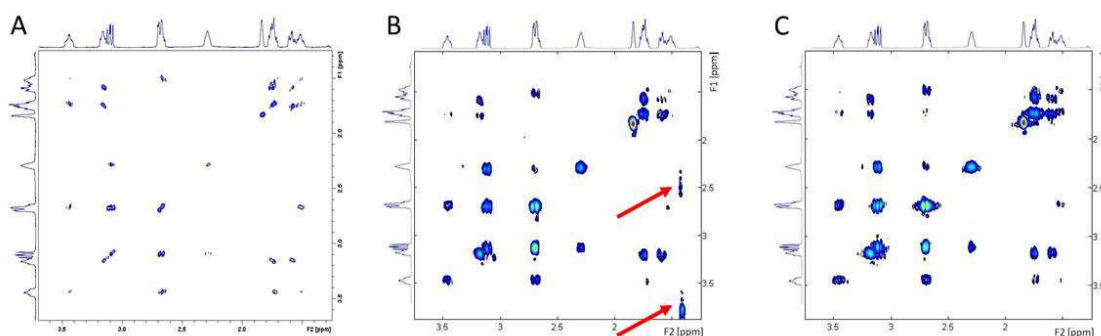


Figura 2.10. (A) Ampliación del espectro tradicional mostrado en la figura 2.9 A. (B) Espectro UF-COSY de tiempo constante. Se puede observar parte de la señal a 3.917 ppm que aparece doblada en esta ventana (↑). (C) Igual que B, pero se ha aplicado una presaturación sobre esta señal.

Las figuras 2.9 y 2.10 muestran diferentes ejemplos de experimentos COSY y tradicional y UF-COSY de tiempo constante. Todos los espectros se han obtenido con una muestra de quinina 50 mM en CDCl_3 a 500 MHz. En la figura 2.9.A se muestra una ampliación del espectro COSY tradicional, cuyas ventanas espectrales fueron $SW_1 = 10.25$ ppm y $SW_2 = 10.25$ ppm. El tiempo total de adquisición de este experimento fue de 31 min 30 s. En la figura 2.9.B se muestra el experimento UF-COSY de tiempo constante. Las anchuras espectrales para este experimento fueron $SW_1 = 3.5$ ppm y $SW_2 = 3$ ppm. Se adquirieron 2 scans en un tiempo de 20.21 s. Se puede observar la alta intensidad de la señal a 3.917 ppm. Esto hace que las señales de corte se vean muy poco intensas, debido a que no es posible aumentar el umbral y el número de niveles del mapa de contornos sin que esta señal tan intensa introduzca artefactos en el espectro. Por esta razón se ha intentado suprimirla. Empleando las secuencias de UF-NMR es posible eliminar señales concretas del mismo modo que se hace en los experimentos tradicionales. En este caso se ha aplicado una saturación de onda continua sobre dicha señal previa a la realización del experimento COSY (figura 2.9.C). De ese modo es posible ajustar mejor los niveles de los contornos del espectro. Por otro lado, es posible aumentar la ganancia del receptor del equipo de resonancia, lo que también favorece la

visualización de las señales de corte. La ventana adquirida y el tiempo de adquisición del espectro de la figura 2.9.C son los mismos a los del espectro de la figura 2.9.B.

En la figura 2.10.A se muestra la ampliación del espectro COSY tradicional a la misma ventana de los espectros UF-COSY en B y C. Los espectros en B y C corresponden a espectros UF-COSY de tiempo constante con anchuras espectrales $SW_1 = 2.8$ ppm y $SW_2 = 2.5$ ppm, y tiempo de adquisición de 20.24 s. En el espectro 2.10.B puede observarse que la señal a 3.917 ppm, a pesar de estar fuera de la ventana de adquisición, aparece doblada dentro de la ventana espectral. Aplicando un esquema de presaturación de onda continua a esta frecuencia es posible eliminar completamente el artefacto (figura 2.10.C).

Los parámetros experimentales de los espectros de las figura 2.9 y 2.10 se detallan en el [apartado VI.3.2](#).

2.2. Monitorización del acoplamiento escalar heteronuclear

2.2.1. Acoplamiento ^1H , ^{13}C

Mediante las técnicas de RMN ultrarrápida también es posible obtener espectros bidimensionales que codifican correlaciones heteronucleares. En el desarrollo de esta Tesis se han obtenido espectros HSQC y HMBC ultrarrápidos. Para ello se ha empleado la secuencia mostrada en la figura 2.11. Dicha secuencia hace uso de la técnica de UF-NMR modulada en amplitud, codificando la correlación mediante pulsos *chirp* de 90° . Anterior y posterior a los pulsos de codificación espacial, se usan dos bloques *INEPT* que permiten la codificación de la correlación y la transferencia de polarización. Del mismo modo que en la RMN tradicional el tiempo d se define igual al valor de $1/4J$, donde J es la constante de acoplamiento de las señales buscadas. Este esquema presenta una diferencia respecto al esquema planteado por Frydman¹¹¹, el cual propone el uso de pulsos duros de 180° sobre el núcleo X durante la adquisición en el canal del ^1H para desacoplar las señales. En nuestro caso hemos usado el desacoplador de onda continua aplicado durante toda la adquisición, del mismo modo que se hace en la espectroscopía tradicional. Esta secuencia se ha empleado en primer lugar para la obtención de espectros 2D ultrarrápidos de correlación de desplazamientos químicos ^1H , ^{13}C .

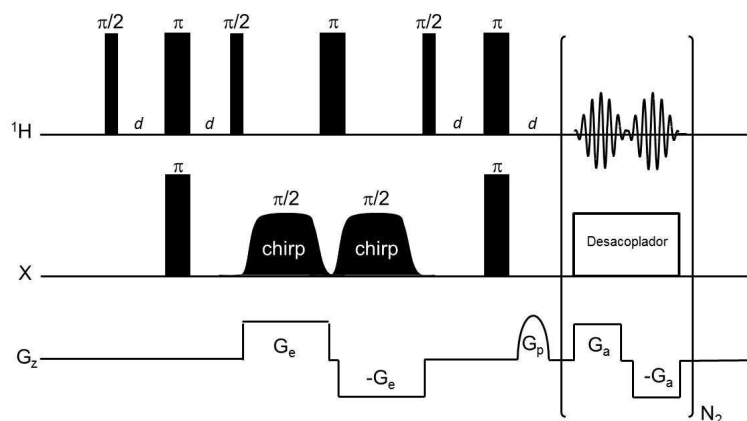


Figura 2.11. Esquema del experimento UF-HSQC y UF-HMBC de correlación heteronuclear modulada en amplitud.

¹¹¹ Frydman, L.; Lupulescu, A.; Scherf, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 9204-9217.

2.2.1.1. UF-HSQC

Para la obtención de los espectros UF-HSQC ^1H , ^{13}C se ha aplicado la secuencia mostrada en la figura 2.11, cuyo programa de pulsos ([ufhsqc.ucm](#)) se ha incluido en el anexo A. En este caso el tiempo de espera d seleccionado corresponde a los valores adecuados para el acoplamiento ^1H , ^{13}C a 1 enlace ($^1J_{\text{C,H}}$).

En los experimentos UF-HSQC de muestras no enriquecidas muy concentradas (300 mM) se hace necesario adquirir al menos dos *scans* para eliminar las señales ^1H , ^{12}C . En el primer *scan* los pulsos *chirp* de excitación de 90° poseen la misma fase. En el segundo *scan* la fase del segundo pulso *chirp* se desplaza 180° . La fase del receptor está en concordancia con la fase del primer pulso de excitación.

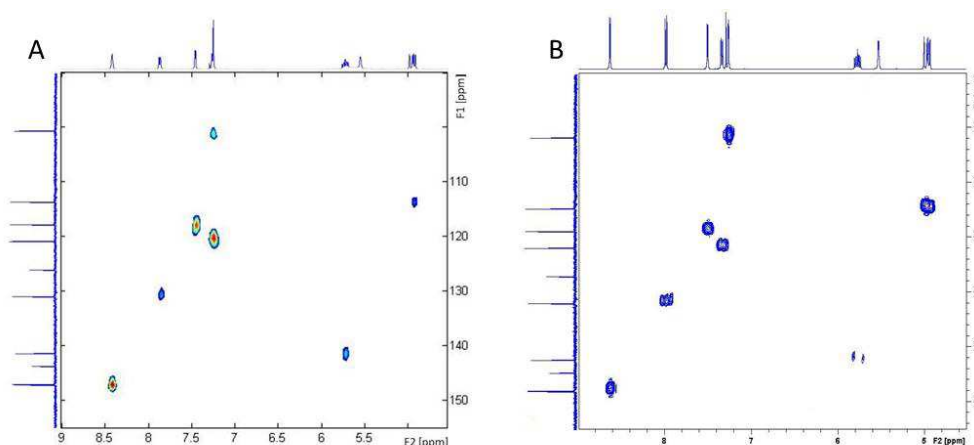


Figura 2.12. Espectros HSQC de la quinina registrados a 500 MHz (A) UF-HSQC de una muestra 300 mM. (B) HSQC tradicional de una muestra 50 mM.

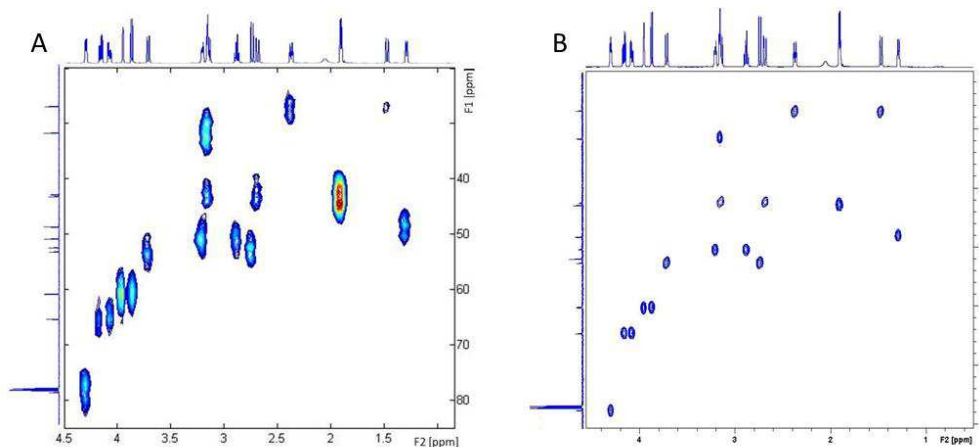


Figura 2.13. Espectros HSQC de la estricnina registrados a 700 MHz (A) UF-HSQC de una muestra 300 mM. (B) HSQC tradicional de una muestra 20 mM.

En la figura 2.12 se muestran (A) el espectro UF-HSQC ^1H , ^{13}C de una muestra 300mM de quinina en CDCl_3 y (B) el espectro tradicional HMQC de una muestra 50 mM a 500 MHz. El tiempo de adquisición del espectro UF-HSQC fue de 1 min 20 s ya que se han adquirido 8 *scans*. Para este espectro el intervalo d seleccionado ha sido 1.67 ms para la monitorización de los acoplamientos de 150 Hz. El tiempo de adquisición del espectro HMQC tradicional fue 14 min 15 s y la constante de acoplamiento monitorizada

de 155 Hz. En el caso del experimento tradicional se ha seleccionado un experimento HMQC que da como resultado el mismo espectro que el experimento HSQC pero que se emplea en el caso de moléculas de pequeño tamaño. Como en el caso de los experimentos homonucleares la principal diferencia entre el experimento ultrarrápido y el tradicional, aparte del tiempo de adquisición, son las anchuras espectrales, que para el UF-HSQC fueron: $SW_1 = 74$ ppm y $SW_2 = 4.5$ ppm, y para experimento tradicional fueron: $SW_1 = 165.65$ ppm y $SW_2 = 10$. Los parámetros experimentales de ambos experimentos se describen en [el apartado VI.4.1](#).

La figura 2.13.A muestra el espectro UF-HSQC de una muestra 300 mM de la estricnina a 700 Hz. En este caso se adquirieron 2 scans de modo que el tiempo del experimento fue 20.07 s. La figura 2.13.B muestra el espectro tradicional de una muestra 20 mM. El tiempo total del experimento fue 9 min 34 s. En el [apartado VI.4.1](#) se detallan los parámetros de ambos experimentos.

2.2.1.2. UF-HMBC

Aplicando la misma secuencia de los experimentos UF-HSQC pero ajustando el intervalo d para monitorizar las correlaciones a 2 y 3 enlaces ($^2J_{C,H}$ y $^3J_{C,H}$), se obtienen espectros UF-HMBC.

Es importante destacar que debido al aumento en el valor del intervalo d en los experimentos UF-HMBC, la intensidad de la señal es menor comparada con la de su experimento análogo UF-HSQC. Por esta razón en la mayoría de los casos ha sido necesario adquirir más de un *scan* para obtener un valor de la relación S/R razonable.

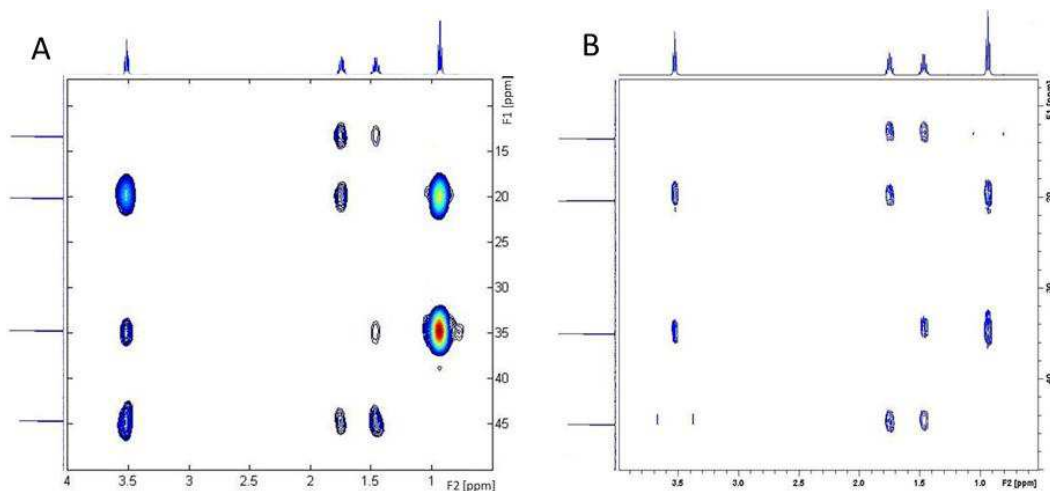


Figura 2.14. (A) Experimento UF-HMBC $^1H, ^{13}C$ y (B) Experimento HMBC $^1H, ^{13}C$ tradicional de una muestra de cloruro de butilo 300 mM a 500 MHz.

En la figura 2.14 se muestran (A) el espectro UF-HMBC $^1H, ^{13}C$ de una muestra 300 mM de cloruro de butilo en $CDCl_3$ y (B) el espectro tradicional HMBC de la misma muestra a 500 MHz. Para el experimento UF-HMBC se han adquirido 4 *scans* por lo que el tiempo de adquisición fue de 40.40 s y el del espectro HMBC tradicional 8 min 31s. Para el espectro UF-HMBC las anchuras espectrales fueron $SW_1 = 50$ ppm y $SW_2 = 4$ ppm, mientras que para el experimento tradicional fueron $SW_1 = 250$ ppm y $SW_2 = 13$. Los

parámetros experimentales de ambos experimentos se describen en el [apartado VI.4.1](#). En el espectro UF-HMBC se ha seleccionado una constante de acoplamiento de 9 Hz y en el experimento tradicional 10 Hz.

2.2.2. Acoplamiento ^1H , ^{15}N

Para la obtención del espectro UF-HSQC ^1H , ^{15}N se ha empleado una muestra de ubiquitina humana 1 mM en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10), enriquecida en ^{15}N . Debido a que el espectro HSQC de dicha muestra presenta un número elevado de señales de correlación, se necesita conseguir un espectro con la mayor resolución posible. Por ello, se ha empleado una secuencia UF-HSQC de tiempo constante ya que los espectros obtenidos con este esquema poseen una mayor resolución que los que se obtienen mediante los esquemas modulados en amplitud. El esquema de la secuencia UF-HSQC de tiempo constante se muestra en la figura 2.15. Para obtener una resolución alta se ha seleccionado, además, una ventana moderada ($SW_1 = 12$ ppm y $SW_2 = 3$ ppm) y los parámetros de adquisición que permiten la mayor resolución sin que se produzcan pérdidas apreciables debidas a la difusión. Para ello los valores de los gradientes de la codificación y adquisición deben tener un valor menor del 80% del valor máximo posible y el tiempo de codificación debe ser moderado ($t_1^{\text{max}} < 20$ ms).

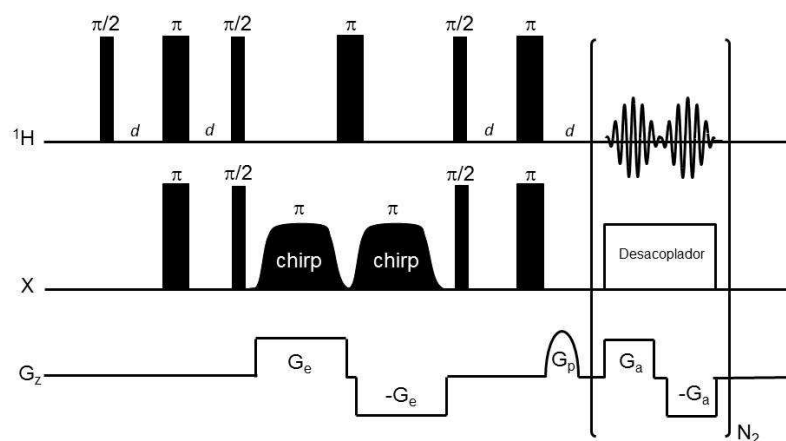


Figura 2.15. Esquema de la secuencia UF-HSQC de tiempo constante

En el registro de este espectro es necesario eliminar la señal del agua. Para ello, en el espectrómetro de 500 MHz, se ha programado una presaturación del disolvente, previa a la secuencia UF-HSQC, empleando una irradiación mediante onda continua centrada en la frecuencia de la señal del agua. Para eliminar completamente la señal del agua es necesario adquirir al menos dos *scans* en el que las fases de los pulsos de 90° del ^{15}N se encuentran desfasados 180° , a la vez que se desfasa el receptor entre ambas adquisiciones. Debido a la baja concentración de la muestra, para este espectrómetro, no se ha obtenido un espectro con suficiente relación S/R y resolución.

El esquema de presaturación anterior no elimina completamente la señal de agua en el espectrómetro AV700, equipado de una criosonda TCI, por lo que ha sido necesario programar un esquema *watergate* de pulsos 3-9-19. Del mismo modo que en el caso anterior, para eliminar completamente la señal del agua, es necesario adquirir al menos

dos *scans* en el que los pulsos de 90° del ^{15}N están en fase en el primero y en antifase en el segundo, al mismo tiempo que la fase del receptor posee la misma fase que el primer pulso de 90° . El programa de pulsos ([ufhsqcCTw9.ucm](#)) para este experimento se ha incluido también en el Anexo A. Los espectros HSQC ^1H , ^{15}N ultrarrápidos y tradicional de la ubiquitina 1 mM en el equipo de 700 MHz, se muestran en la figura 2.16. Si bien la intensidad de las señales de correlación obtenidas en el espectro UF-HSQC (A) es satisfactoria, destaca negativamente la calidad del espectro en relación a la forma de línea. No hemos encontrado por el momento una solución adecuada. Los parámetros experimentales se han detallado en el [apartado VI.4.2](#).

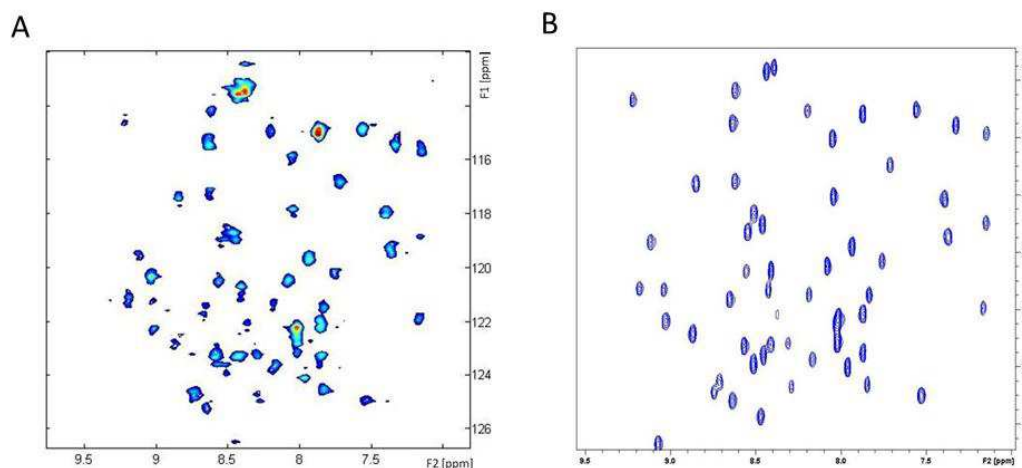


Figura 2.16: (A) Espectro UF-HSQC ^1H , ^{15}N y (B) Espectro HSQC ^1H , ^{15}N tradicional de una muestra de ubiquitina 1 mM en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10), enriquecida en ^{15}N registrados a 700 MHz

Las anchuras espectrales del experimento UF.HSQC fueron $\text{SW}_1 = 14$ ppm para el ^{15}N y $\text{SW}_2 = 3$ ppm para el ^1H . El tiempo de adquisición de este espectro fue 1 min 20 s. Las anchuras espectrales del experimento HSQC tradicional fueron $\text{SW}_1 = 40$ ppm para el ^{15}N y $\text{SW}_2 = 14$ ppm para el ^1H . Este experimento se adquirió en 9 min 50 s.

2.2.3. Acoplamiento ^1H , ^{31}P

La secuencia UF-HMBC se ha aplicado también para monitorizar la correlación ^1H , ^{31}P . En este caso particular se han adquirido espectros UF-HMBC empleando la secuencia de la figura 2.10 en la que el intervalo d se ha ajustado para detectar acoplamientos con valores de J entre 8 y 10 Hz. En estos experimentos no se conecta el desacoplador durante la adquisición. En la figura 2.17 se muestra un ejemplo del espectro UF-HMBC ^1H , ^{31}P registrado a 500 MHz con una muestra mezcla de fosfonato de dietilbencilo 146.2 mM (**1**) y de clorofosfonato de dietilo 96.6 mM (**2**) en CDCl_3 , empleando una sonda BBO. El tiempo de adquisición del experimento ultrarrápido fue 40.40 s y el del experimento tradicional 14 min. Los datos de adquisición para los experimentos de la figura 2.17 se han incluido en el [apartado VI.4.3](#).

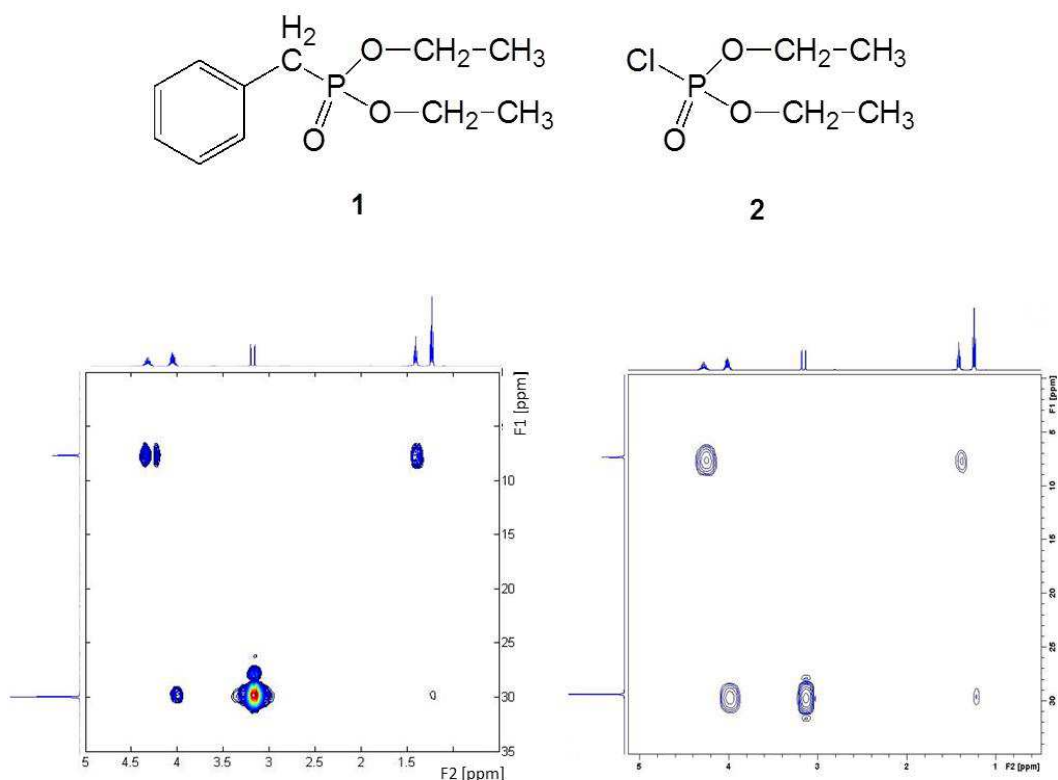


Figura 2.17. (A) Espectro UF-HMBC ^1H , ^{31}P y (B) espectro HMBC ^1H , ^{31}P tradicional registrados a 500 MHz

En el caso del experimento UF-HMBC (figura 2.17 A) se ha realizado una presaturación de la señal a 3.13 ppm en ^1H , lo que permite reducir la intensidad de la señal de correlación (29.8 ppm en ^{31}P y 3.13 ppm en ^1H) aunque no eliminarla completamente. Esta señal proviene del grupo CH_2 unido directamente al ^{31}P en **1**, es decir, proviene de una correlación a 2 enlaces, por lo que es mucho más intensa que las demás correlaciones, que se producen a 3 enlaces. Mediante la presaturación se reduce esta señal de correlación permitiendo que las demás señales se puedan apreciar con mayor claridad.

2.3. Estudio de sistemas dinámicos

Como se ha comentado en la introducción, la drástica reducción del tiempo de adquisición que permiten conseguir las técnicas UF-NMR 2D, las hacen adecuadas para su aplicación en la monitorización de sistemas dinámicos en tiempo real. Por ello, uno de los objetivos de esta Tesis se centra en el desarrollo de las secuencias de UF-NMR 2D adecuadas para la monitorización de dichos sistemas.^{112, 113}

2.3.1. Seguimiento homonuclear mediante UF-TOCSY

En primer lugar se ha programado una secuencia UF-TOCSY, similar a la mostrada en la figura 2.2, pero que se repite de forma continua, de modo que se adquieren experimentos TOCSY según avanza el proceso dinámico. Se ha de tener en cuenta que antes de realizar cada nuevo experimento TOCSY es necesario esperar un tiempo de repetición, TR, como se muestra en la figura 2.18, para permitir que la magnetización se relaje completamente. El programa de pulsos ([uftocsyDYN.ucm](#)) se ha incluido en el Apéndice A.

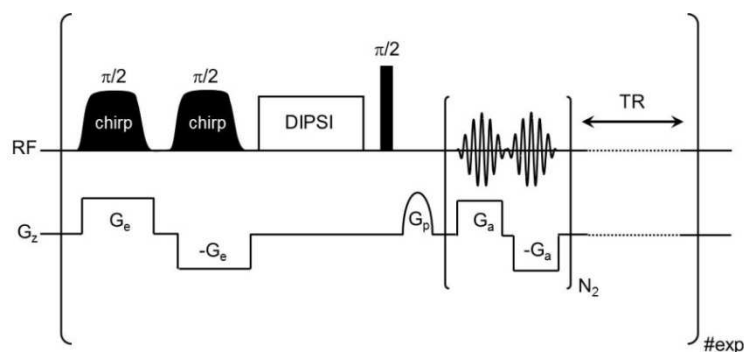


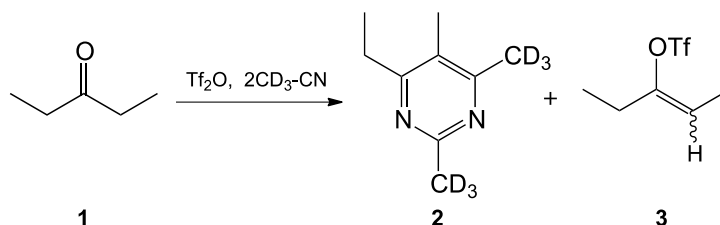
Figura 2.18. Esquema de la secuencia UF-TOCSY dinámica para la monitorización de sistemas dinámicos en tiempo real.

Los experimentos UF-TOCSY individuales se adquieren como experimentos monodimensionales. El experimento UF-TOCSY dinámico se obtiene como un experimento bidimensional, de modo que cada fila corresponde a un experimento UF individual. Por tanto, la segunda dimensión del experimento bidimensional corresponderá al número de veces que se repite el UF-TOCSY. Estos experimentos se separan antes de ser procesados.

La secuencia UF-TOCSY anterior se ha aplicado al estudio en tiempo real, a 500 MHz, de la reacción entre la 3-pentanona (**1**) y el anhídrido triflico (Tf_2O) en presencia de acetonitrilo- d_3 que da lugar a 4-etil-2,5,6-trimetilpirimidina- d_6 (**2**) y a triflato de E/Z-1-etil-propen-1-ilo (**3**) como producto minoritario.

¹¹² Herrera, A.; Fernández-Valle, E.; Martínez-Álvarez, R.; Molero, D.; Pardo, Z. D.; Sáez, E.; Gal, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6274-6277.

¹¹³ Herrera, A.; Fernández-Valle, E.; Gutiérrez, E. M.; Martínez-Álvarez, R.; Molero, D.; Pardo, Z. D.; Sáez, E. *Org. Lett.* **2010**, *12* (1), 144-147.



La reacción se realiza en el interior del tubo de resonancia de 5 mm. Para llevar a cabo la adición se ha diseñado un dispositivo de mezcla (figura 2.19). La descripción de dicho sistema de inyección se puede consultar en el [apartado VI.5](#).

Una vez montado el dispositivo de inyección y ajustada la altura del tubo de resonancia, éste se introduce en el imán. El tubo de teflón es lo suficientemente largo para permitir la inyección del reactivo de forma cómoda fuera del imán.

Previo a la realización de los experimentos UF-TOCSY que han de monitorizar la reacción, se llevaron a cabo los ajustes estándar (ajuste de los valores del *lock*, de la sintonía de la sonda y la homogeneidad del campo).

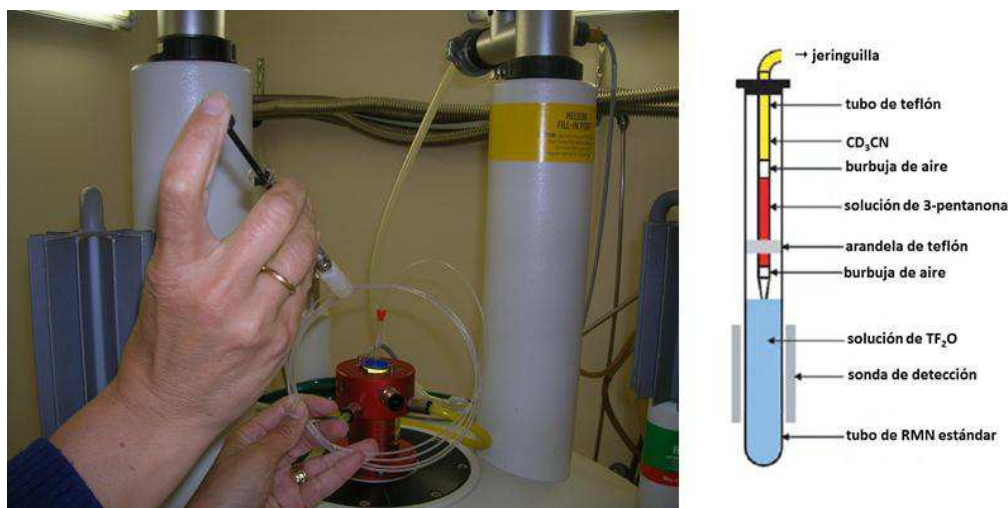


Figura 2.19. Imagen y esquema del sistema de mezcla que permite que la reacción tenga lugar dentro del tubo de resonancia.

La adquisición del experimento dinámico se inició con antelación a la inyección de la solución de la 3-pentanona (**1**), registrándose dos experimentos previos a la inyección. La adquisición continúa durante la inyección y reacción posterior. Aunque el tiempo necesario para la inyección no es mayor al tiempo que se necesita para adquirir un espectro, los artefactos producidos por la difusión de los reactivos y la inhomogeneidad de la muestra pueden apreciarse en dos o tres espectros. Tras éstos la homogeneidad de la muestra se recupera casi en su totalidad y los efectos de la difusión dejan de ser importantes por lo que la resolución de los espectros es ya comparable a la de los experimentos estáticos.

En total se adquirieron 525 experimentos TOCSY cada 10 segundos (TR). Los parámetros de cada experimento se han incluido en el [apartado VI.5.1](#). Con dichos parámetros las anchuras espectrales en ambas dimensiones fueron $SW_1 = 3.63 \text{ ppm}$ y $SW_2 = 3.50 \text{ ppm}$. La secuencia de *spin-lock* se aplicó durante 20 ms. Este valor del tiempo de mezcla da lugar a espectros de correlación COSY. Se podría utilizar un valor mayor del

tiempo de mezcla, lo que permitiría detectar señales de correlación TOCSY, pero en ese caso los espectros poseen un gran número de señales de correlación que hace más difícil la asignación de todas las señales. El tiempo de mezcla empleado además es suficiente para el objetivo del experimento. El tiempo total para cada experimento UF-TOCSY fue de 0.138 s.

En la figura 2.20 se muestran una selección de los espectros obtenidos en diferentes instantes de la reacción. Las flechas coloreadas indican la aparición y desaparición del reactivo (↖, ↗), los intermedios detectados (↘, ↙) y los productos finales (↗, ↘). Los espectros aquí mostrados se han procesado por separado usando los mismos parámetros: no se ha realizado ningún ajuste de *shearing*; se ha realizado un llenado con ceros en la dirección t_2 y los espectros presentados corresponden a los obtenidos con los datos adquiridos durante los gradientes positivos.

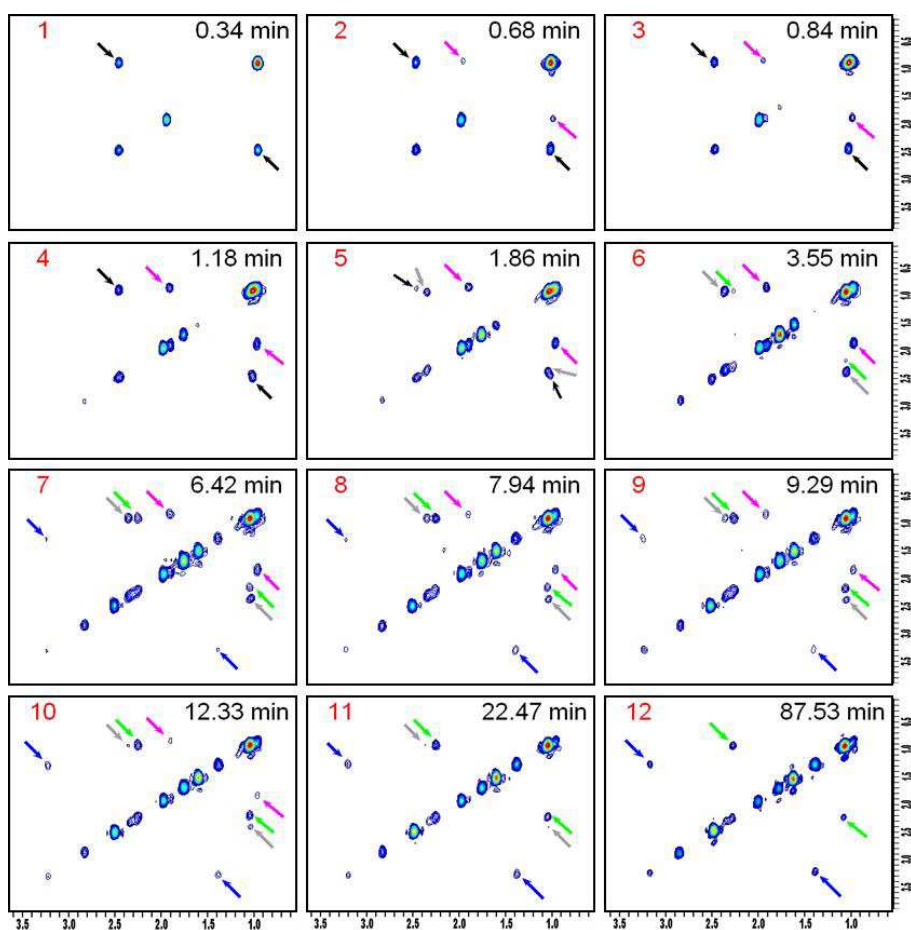


Figura 2.20. Espectros UF-TOCSY obtenidos en el curso de la reacción de la 3-pentanona y el Tf_2O en presencia de acetonitrilo para dar lugar a 4-etil-2,5,6-trimetilpirimidina- d_6 (**2**) y triflato de E/Z-1-etil-propen-1-ilo (**3**) como producto minoritario. Las flechas indican las diferentes especies que se detectan en los experimentos UF-TOCSY: el reactivo 3-pentanona (↖, ↗), especies intermedias (↘, ↙) y los productos finales, los triflatos vinílicos E/Z (↗, ↘) y la pirimidina (↗, ↘).

En la figura 2.21 se muestran las curvas correspondientes a la integración de las señales TOCSY de las especies detectadas en función del tiempo. Para el cálculo de los datos de dichas curvas se ha desarrollado un programa escrito en Matlab 7.11. Dicho programa lee todos los ficheros *fid* del experimento y calcula el espectro correspondiente a cada uno de ellos, para lo cual realiza la sustracción del *offset* de la señal, un llenado

con ceros a lo largo de la dimensión directa y la transformada de Fourier respecto a t_2 . En este caso sólo se ha utilizado el espectro calculado con los datos adquiridos durante los gradientes positivos. Para cada espectro se calcula el promedio de la integral de la señal de correlación y de su señal simétrica. En este cálculo se han descartado los tres primeros experimentos a partir del momento de la inyección en los que la resolución no es suficiente para la determinación las integrales correspondientes. En la figura 2.21, se han representado las curvas de la integración de las señales para la 3-pentanona (◆), los intermedios (◆ y ◆) y para los dos productos finales, la pirimidina (◆) y los triflatos vinílicos E/Z (◆). En la figura se observa cómo el producto inicial, la 3-pentanona (◆), desaparece con el tiempo, los intermedios (◆ y ◆) aparecen rápidamente al inicio de la reacción y van desapareciendo conforme avanza ésta. Los productos finales (◆ y ◆) se detectan según avanza la reacción. Además, a partir de estas curvas, se calculan el tiempo de vida medio del producto inicial y de los intermedios. Este valor se calcula mediante el ajuste de las curvas a la ecuación $I(\tau) = I_0 e^{(-\tau/t_{1/2})} + I_\infty$. En cada caso se ha escogido un punto para el valor de I_0 diferente. Para la 3-pentanona (◆) se seleccionó el primer punto medido, que corresponde a 30.415 s. Para los intermedios (◆ y ◆) se han seleccionado 71 s y 193 s. Estos valores se representado en la figura 2.21.

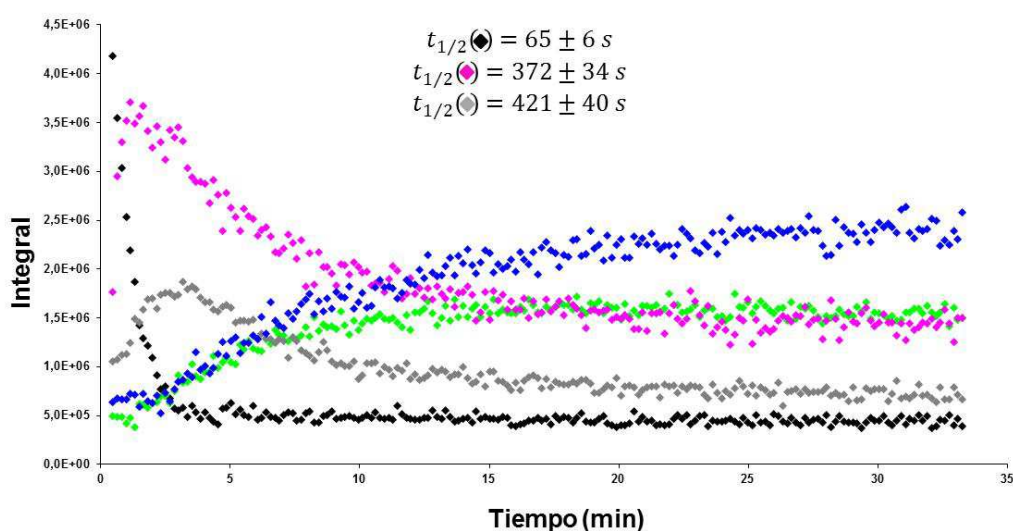
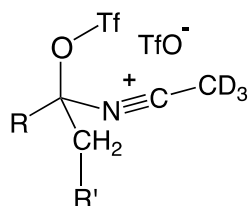


Figura 2.21. Integrales promedios de las señales de correlación de la 3-pentanona(◆), de los intermedios (◆ y ◆) y de los dos productos finales, la pirimidina (◆) y los triflatos vinílicos (◆) como función del tiempo.

El análisis sobre la estructura de los intermedios detectados (◆ y ◆) y su implicación en las rutas mecanísticas posibles se encuentran fuera de los objetivos de la presente Tesis y constituyen parte de otra que se apoya en datos de modelización molecular junto con los de UF-TOCSY. De forma ilustrativa, la estructura de los intermedios detectados es coherente con la formación de sales de nitrilio a lo largo de la reacción, como se muestra seguidamente:



2.3.2. Seguimiento heteronuclear mediante UF-HMBC

A pesar de los buenos resultados conseguidos mediante la monitorización de esta reacción con los experimentos UF-TOCSY no es posible obtener información directa acerca de los cambios estructurales que sufre el centro reactivo del proceso estudiado, que es el átomo de carbono carbonílico, ya que su evolución no puede detectarse mediante experimentos homonucleares o mediante experimentos heteronucleares HSQC. Sin embargo la secuencia UF-HMBC puede darnos información directa acerca de dichos cambios.

Por ello se decidió desarrollar un programa de pulsos que fuese capaz de adquirir experimentos UF-HMBC (figura 2.11) de forma continua del mismo modo que lo hace la secuencia dinámica UF-TOCSY mostrada en la figura 2.18.

Sin embargo, en los experimentos de RMN ultrarrápida las anchuras espectrales de ambas dimensiones no son independientes. Cuanto mayor es la anchura espectral en ambas direcciones peor es la resolución espectral del dominio indirecto. Además la anchura y, por tanto, la resolución espectral del dominio indirecto dependen de la intensidad del gradiente de decodificación, G_a , y de su duración, T_a . Para detectar los posibles intermedios es necesario abarcar un rango espectral en el dominio indirecto muy grande. Por esta razón se decidió monitorizar dos ventanas del ^{13}C diferentes para abarcar todo el dominio espectral sin pérdida de resolución. Esto podría llevarse a cabo en dos experimentos independientes lo que significaría realizar dos reacciones diferentes. No obstante, hay que tener en cuenta que las reacciones independientes no ocurren exactamente en las mismas condiciones debido al sistema de inyección de los reactivos. Por esta razón, se ha desarrollado una secuencia con la que es posible monitorizar ambas ventanas en el mismo experimento. El esquema de dicha secuencia se muestra en la figura 2.22. La secuencia se trata de un experimento UF-HMBC de codificación continua modulada en amplitud (figura 2.11) en la que el intervalo d se define a 25 ms para monitorizar los acoplamientos $^2J_{\text{C,H}}$ y $^3J_{\text{C,H}}$ de 10 Hz. La secuencia se repite para realizar el seguimiento dinámico de la reacción que tendrá lugar en el tubo de resonancia. Para permitir el registro de dos ventanas en el mismo experimento se alterna el *offset* de la frecuencia del dominio indirecto.

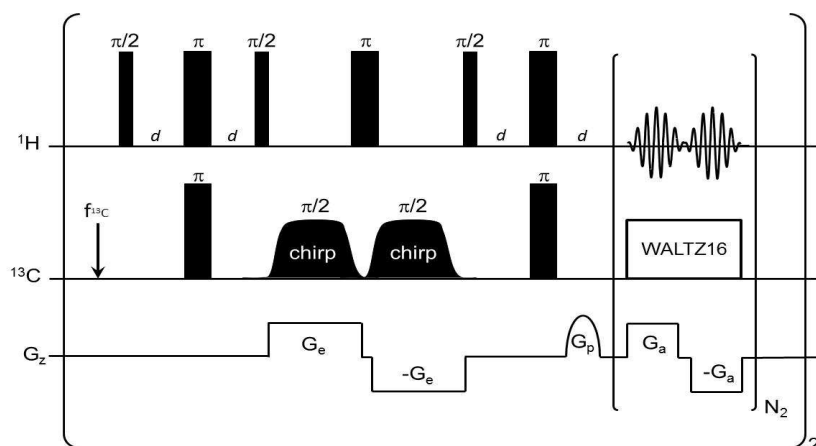
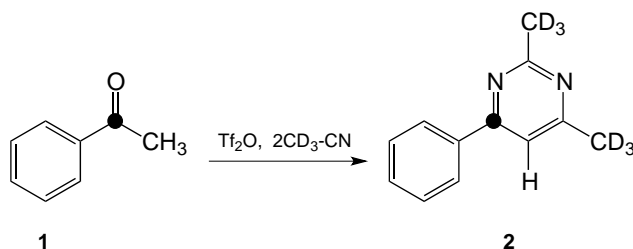


Figura 2.22. Esquema de la secuencia UF-HMBC de doble ventana dinámica para la monitorización de sistemas dinámicos.

Para la aplicación de la secuencia descrita se seleccionó la reacción de la acetofenona (**1**) con el TiF_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 para dar lugar a la 2,4-dimetil-6-fenilpirimidina- d_6 (**2**) como producto principal.



En este caso se empleó acetofenona (**1**) marcada en ^{13}C en el grupo carbonilo lo cual nos asegura la detección de intermedios de vida corta evitando así los problemas de sensibilidad propios de la secuencia UF-HMBC. La reacción se llevó a cabo en un espectrómetro de 500 MHz empleando el sistema de inyección descrito con anterioridad ([figura 2.19](#) y [apartado VI.5.](#)).

La adquisición del experimento dinámico comenzó de forma previa a la inyección del reactivo. A los 20 s, cuando se habían adquirido dos experimentos, uno para cada ventana, se realizó la inyección. En total se adquirieron 219 experimentos UF-HMBC para cada ventana en 112 minutos.

Los parámetros de adquisición de cada experimento UF-HMBC se pueden consultar en el [apartado VI.5.2](#). La ventana de ^1H seleccionada abarcaba de 9 a 2 ppm. Para el ^{13}C se seleccionaron dos ventanas: la primera comprendida entre 210 y 150 ppm y la segunda entre 180 y 120 ppm. El tiempo total de cada experimento UF-HMBC fue 5.37 s y los experimentos se repitieron cada 10 s

En la figura 2.23 se muestran algunos espectros representativos de los resultados obtenidos para la primera ventana (figura 2.23 A) y la segunda ventana (figura 2.23 B). Los espectros se han procesado por separado empleando los mismos parámetros de procesamiento: no ha sido necesario realizar ningún ajuste del *shearing* puesto que las diferencias entre los gradientes positivos y negativos se han corregido durante la adquisición del experimento y se ha aplicado un llenado con ceros en la dirección t_2 . Los espectros representados corresponden a la suma de los espectros obtenidos mediante los gradientes positivos y negativos, para lo cual ha sido necesario corregir el desplazamiento entre ambos espectros antes de realizar la suma. Las flechas coloreadas muestran las diferentes especies que coexisten a lo largo del proceso dinámico y que se detectan en los espectros. Las flechas **rojas** indican la señal correspondientes a la acetofenona (**1**) debido al acoplamiento $^2J_{\text{C,H}}$; las flechas **naranjas** y **verdes** las corresponden a las señales de los productos intermedios generados en la reacción y las flechas **azules** corresponden a la pirimidina (**2**) como producto final.

Del mismo que se ha hecho para el seguimiento de la reacción mediante los experimentos UF-TOCSY, es posible obtener las curvas de las integrales de las señales frente al tiempo (figura 2.24). Para ello se ha modificado el programa del cálculo de las integrales desarrollado para los experimentos UF-TOCSY para adecuarlo a las posiciones de las señales de los espectros UF-HMBC. En este caso, además, no se promedian las señales de correlación debido a que los espectros UF-HMBC no son simétricos como lo son los homonucleares. El programa procesa los espectros para cada uno de los

experimentos utilizando los mismos parámetros para todos ellos. En este caso los espectros corresponden a la suma de los espectros obtenidos con los datos adquiridos durante los gradientes positivos y negativos. Con los datos de las curvas obtenidas se calcula el tiempo de vida media de los productos de la reacción como se muestra también en la figura 2.24.

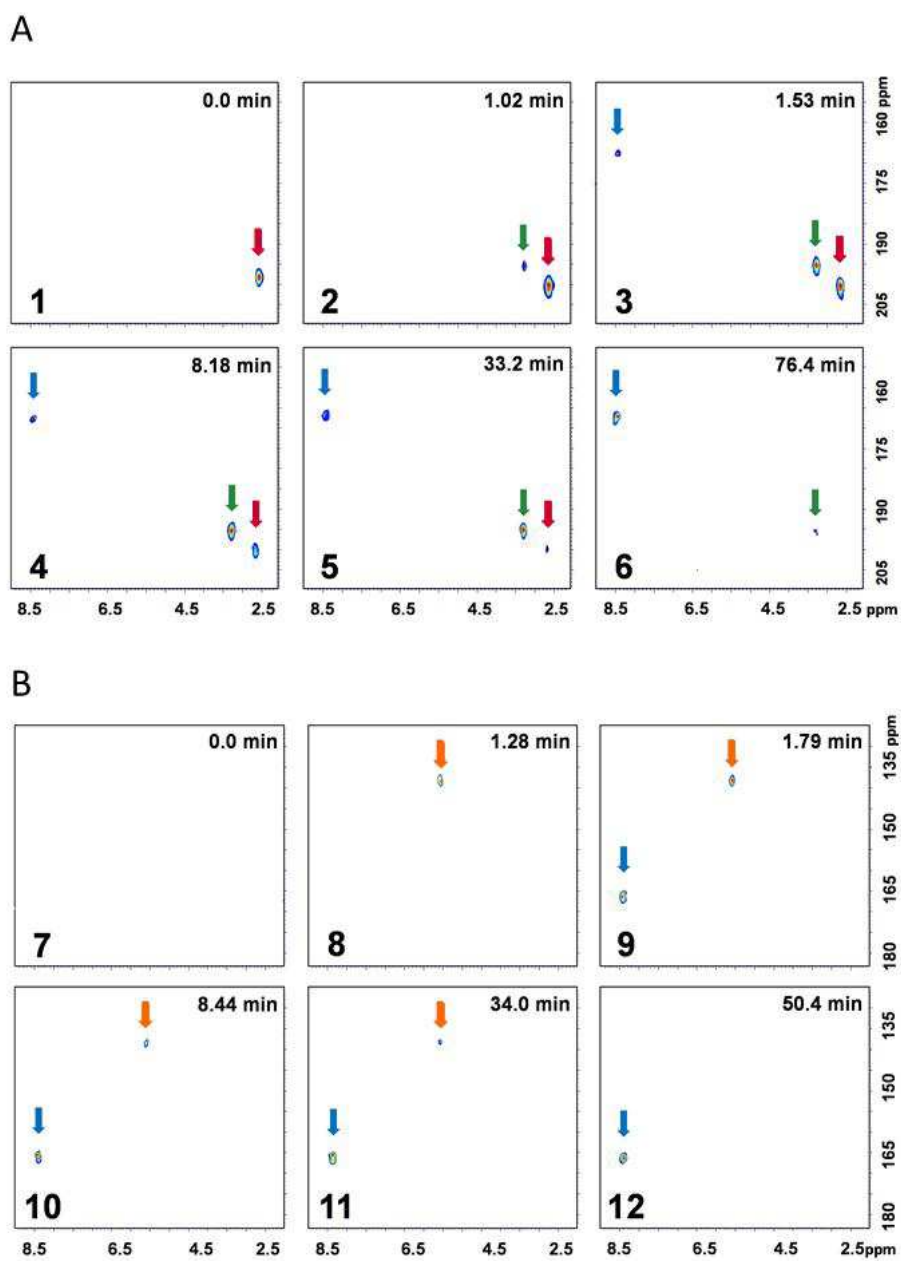


Figura 2.23. Espectros UF-HMBC representativos de la reacción de la acetofenona (**1**) y el Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 . (A) Espectros correspondientes a la primera ventana (9-2 ppm para ^1H y 210 y 150 ppm para ^{13}C). (B) Espectros correspondientes a la segunda ventana (9-2 ppm para ^1H y 180-120 ppm para ^{13}C). Las flechas indican las señales HMBC del producto inicial (flechas rojas), de los intermedios detectados (flechas verdes y naranjas) y del producto final (flechas azules).

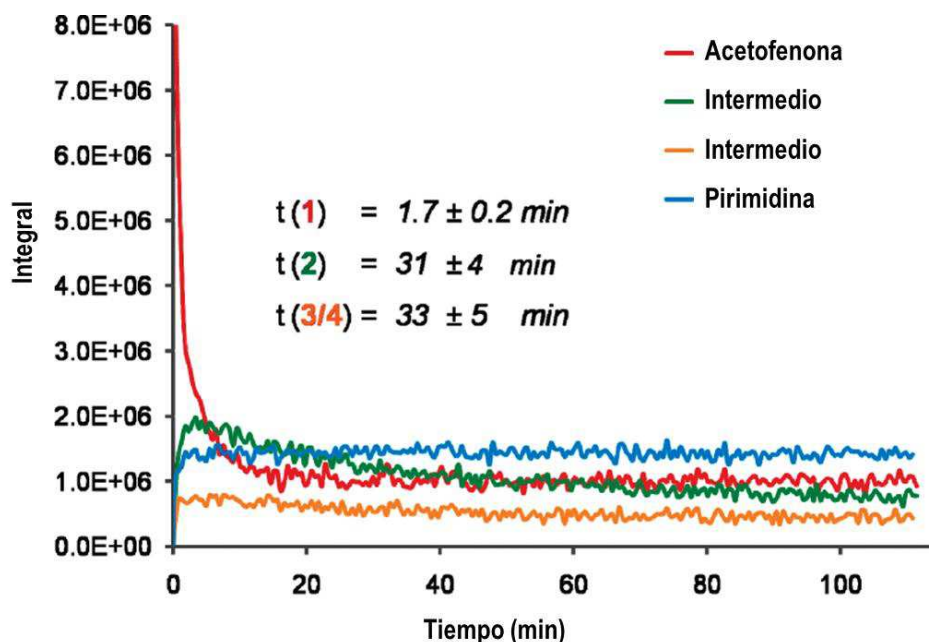
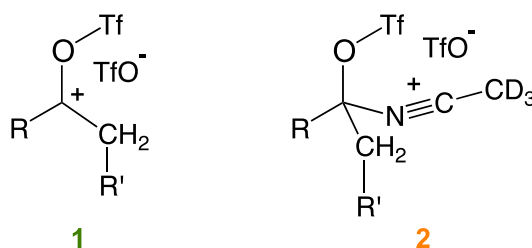


Figura 2.24. Curva de las integrales de las señales de los experimentos UF-HMBC adquiridos durante el curso de la reacción de la acetofenona y el Tf_2O en presencia de CD_3CN frente al tiempo. Ajustando las curvas a la ecuación $I(\tau) = I_0 e^{(-\tau/t_{1/2})} + I_\infty$ se calculan los tiempos de vida media de los productos. En la figura se muestran dichos tiempos para el producto inicial, acetofenona (—) y los intermedios detectados (— y —).

El análisis sobre la estructura de los intermedios detectados (— y —) y su implicación en las rutas mecanísticas posibles se encuentran asimismo fuera de los objetivos de la presente Tesis y constituyen parte de otra que se apoya en datos de modelización molecular junto con los de UF-HMBC. De forma ilustrativa, la estructura de los intermedios detectados es coherente con la formación de complejos salinos **1** y **2** a lo largo de la reacción.



2.3.3. Monitorización combinada mediante UF-TOCSY/HMBC

Como se acaba de comentar, la monitorización dinámica de una reacción en tiempo real puede realizarse a través de la utilización de secuencias UF-NMR homo y heteronucleares. La utilización de estas secuencias va a depender de las características concretas del sistema a estudiar. Así, dependiendo de cuál sea la evolución estructural producida, la aplicación de una u otra estrategia resultará más adecuada. A pesar de ello, siguen quedando preguntas que estas secuencias no son capaces de responder de forma individual.

El estudio combinado de las correlaciones escalares, homo y heteronucleares, $^nJ_{\text{H,H}}$ y $^1J_{\text{C,H}}$, proporcionaría sin duda una información más completa sobre la evolución de

sistemas dinámicos y en concreto acerca de los posibles intermedios y productos formados durante la reacción.

Para estudiar en tiempo real la monitorización simultánea a través de correlaciones homonucleares y heteronucleares, se ha combinado una secuencia UF-TOCSY con una secuencia UF-HMBC. El esquema de la secuencia combinada UF-TOCSY/HMBC se muestra en la figura 2.25. Se ha desarrollado el programa de pulsos ([uftocsyhsqcDYN.ucm](#)) que lleva a cabo la doble secuencia de forma dinámica.

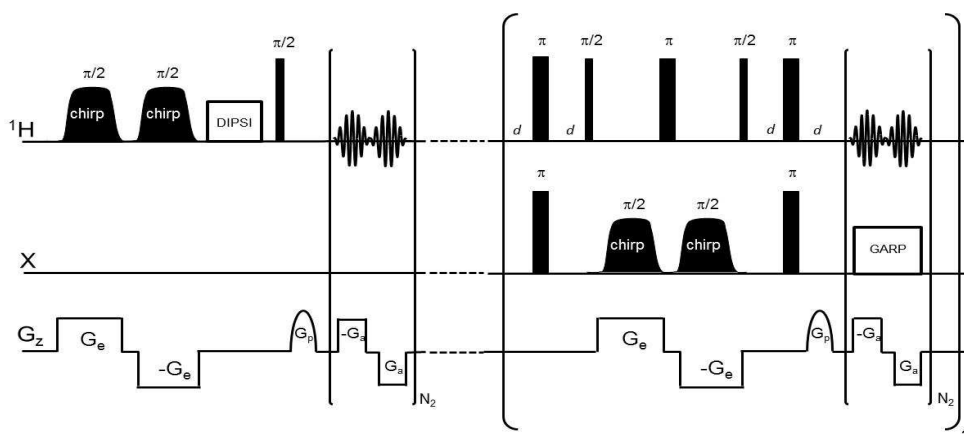
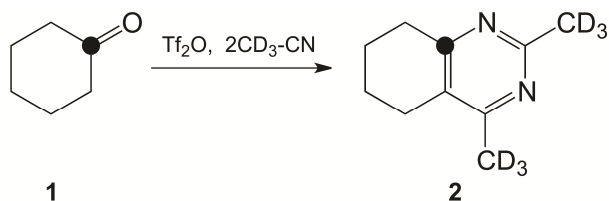


Figura 2.25. Esquema de la secuencia dinámica UF-TOCSY/HMBC para la monitorización de las correlaciones escalares homo y heteronucleares.

Para la aplicación de esta secuencia doble se ha seleccionado la reacción de la ciclohexanona (**1**) con el Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 para dar lugar a 2,4-dimetil-5,6,7,8-tetrahidrobenzo[d]pirimidina- d_6 (**2**) como producto principal. La razón es que este sistema reactivo presenta aspectos particulares, puesto que las cetonas cíclicas poseen una inercia reactiva que la aplicación individual de UF-TOCSY y de UF-HMBC no fueron capaces de explicar.



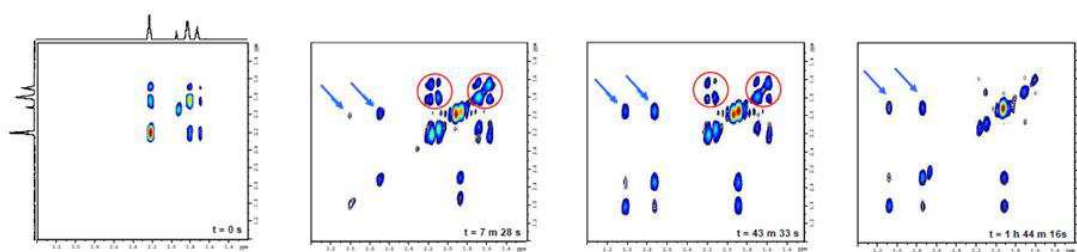
Como ocurría en el caso anterior se ha empleado la ciclohexanona (**1**) marcada en ^{13}C en el grupo carbonilo lo que garantiza un valor de la relación S/R del experimento UF-HMBC adecuada para poder detectar intermedios de vida corta o en baja concentración.

La reacción se llevó a cabo en el interior de un tubo de resonancia de 5 mm, en un equipo de RMN de 500 MHz, empleando el sistema de inyección descrito en la figura 2.19. Los experimentos se realizaron a 5°C para asegurar la detección de intermedios en los primeros momentos de la reacción.

En total se adquirieron 250 experimentos UF-TOCSY y 250 experimentos UF-HMBC en 1h 46min. El tiempo total para cada pareja de experimentos UF-TOCSY y UF-HMBC fue de 25.47 s. Los parámetros experimentales de los espectros realizados se han incluido en el [apartado VI.5.3](#).

La figura 2.26 muestra parejas de espectros UF-TOCSY y UF-HMBC (A y B) registrados consecutivamente en diferentes momentos de la reacción. Con claridad se puede apreciar la aparición de nuevas señales TOCSY y HMBC, que responden a la formación de, al menos un intermedio de reacción. Análogamente a lo expresado con anterioridad, el análisis sobre la estructura del (los) intermedio (s) detectados (↖ y ↗) y su implicación en las rutas mecanísticas posibles se encuentran fuera de los objetivos de la presente Tesis y constituyen parte de otra que se apoya en datos de modelización molecular junto con los de UF-TOCSY/HMBC.

A) UF-TOCSY



B) UF-HMBC

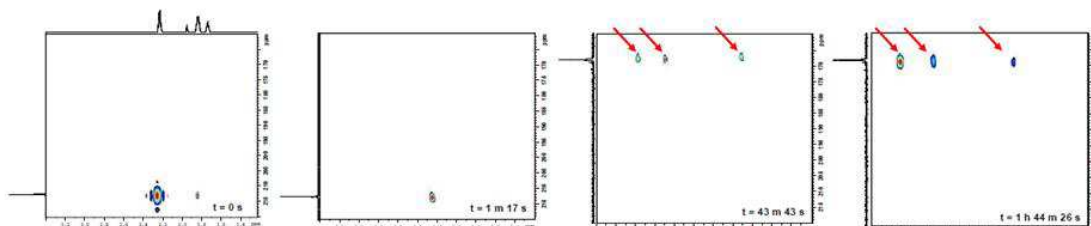


Figura 2.26. Espectros representativos de la monitorización de la reacción de la ciclohexanona (1) con el Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 mediante una secuencia dinámica UF-TOCSY/HMBC (A) Espectros UF-TOCSY. (B) espectros UF-HMBC.

En resumen, en el Capítulo 2 se ha abordado la realización de los experimentos de UF-NMR homo y heteronucleares de correlación escalar y su aplicación al estudio de sistemas dinámicos en tiempo real. Para ello:

- Se han desarrollado nuevos programas de pulsos para la realización de los experimentos de correlación homonuclear *UF-TOCSY* y *UF-COSY* modulados en amplitud y de tiempo constante y heteronuclear *UF-HSQC* y *UF-HMBC* para los núcleos de ^{13}C , ^{15}N y ^{31}P .
- Se han optimizado los parámetros de todas las secuencias desarrolladas para obtener la relación S/R y la resolución óptimas en cada caso, con el objetivo de aplicar las diferentes secuencias al estudio de sistemas dinámicos en tiempo real en el interior del imán.
- Utilizando la secuencia *UF-TOCSY* se ha realizado el seguimiento de la reacción entre la 3-pentanona y el Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 . La reacción se ha llevado a cabo en un equipo estándar de RMN de 500 MHz en el interior de un tubo de resonancia de 5 mm. Se han registrado 525 espectros 2D *UF-TOCSY* en un tiempo de 87.53 min, a partir de los cuales se puede seguir el transcurso de la reacción, detectar la aparición de intermedios y productos, así como la obtención de datos cinéticos.
- Se ha aplicado por primera vez la secuencia *UF-HMBC* en el estudio dinámico de una reacción orgánica análoga a la anterior. A través de las correlaciones heteronucleares detectadas en los 438 espectros *HMBC* obtenidos en 112 min, se ha podido monitorizar la evolución del centro reactivo (carbono carbonílico) a lo largo de la reacción. La secuencia permite la detección de las diferentes especies participantes en el proceso (reactivos, intermedios y productos).
- Se ha empleado por primera vez una secuencia ultrarrápida combinada de correlación homo/heteronuclear (*UF-TOCSY/HMBC*). La sinergia de ambas correlaciones aporta una información completa sobre la evolución del sistema dinámico. Los resultados permiten aportar datos simultáneos de ambas correlaciones empleando para ello un equipo estándar de RMN con un único gradiente en la dirección Z y un único canal de recepción.

CAPÍTULO 3: MONITORIZACIÓN DEL ACOPLAMIENTO DIPOLAR

El objetivo de este capítulo es el desarrollo y optimización de secuencias de RMN ultrarrápida para monitorizar las interacciones dipolares basadas en el efecto NOE.

Para el estudio y verificación de las secuencias dipolares, tanto clásicas como ultrarrápidas, se ha empleado la estricnina como molécula de referencia¹¹⁴ (figura 3.1), en la que sus distancias interatómicas han sido determinadas basándose en experimentos NOE.^{115,116} En primer lugar se ha tratado de discriminar las señales de correlación que son generadas por interacciones NOE de aquellas que provienen de interacciones TOCSY. Para ello se adquirieron los espectros TOCSY (rojo) y NOESY (azul) tradicionales. La superposición de ambos espectros permite determinar las señales de correlación que corresponden a interacciones NOE puras (círculos verdes), por lo que se han seleccionado para el estudio de las secuencias UF-NOESY.

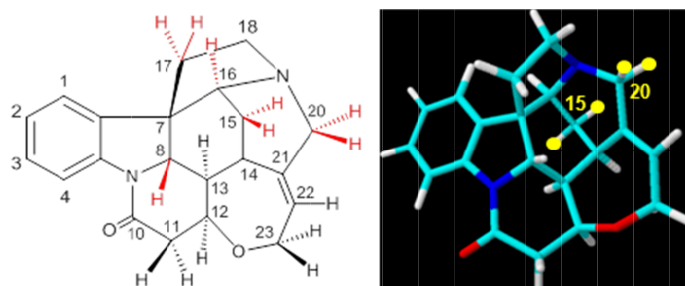


Figura 3.1. Molécula de la estricnina utilizada como compuesto de referencia para verificar la secuencia UF-NOESY.

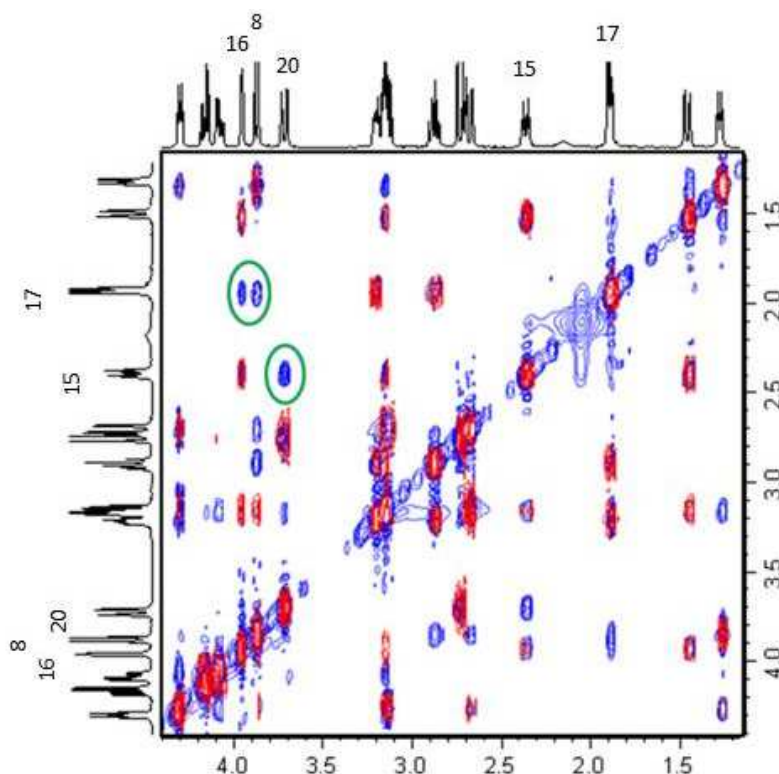


Figura 3.2. Superposición de los espectros 2D NOESY (azul) y TOCSY (rojo) tradicionales de la estricnina. Las señales rodeadas en verde corresponden a interacciones NOE puras.

¹¹⁴ Berger, S.; Braun, S. *200 and more NMR experiments*; Wiley: Weinheim 2004.

¹¹⁵ Butts, C.P.; Jones, C.R.; Harvey, J.N. *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 1193-1195.

¹¹⁶ Butts, C.P.; Jones, C.R.; Towers, E.C.; Flynn, J.L.; Appleby, L.; Barron, N.J. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 177-184.

En la figura 3.2 se muestran las señales seleccionadas, que aparecen exclusivamente en el espectro NOESY. Estas señales corresponden a las interacciones dipolares entre los protones H17/H16 y H15/H20 (figura 3.1). La verificación de las secuencias UF-NOESY desarrolladas se centraron en estas señales.

Los espectros NOESY y TOCSY tradicionales de la figura 3.2 se han adquirido en un espectrómetro de 700 MHz equipado con una criosonda TCI, de una muestra de estricnina 10 mM en CDCl_3 . Los parámetros experimentales de ambos experimentos se han incluido en el [apartado VI.6](#).

3.1. Secuencia UF-NOESY

Se han programado diferentes secuencias UF-NOESY basadas en los esquemas de codificación espacial modulado en amplitud ([ufnoesy.ucm](#)) y de tiempo constante ([ufnoesyCT.ucm](#)) cuyos esquemas se muestran en la figura 3.3.

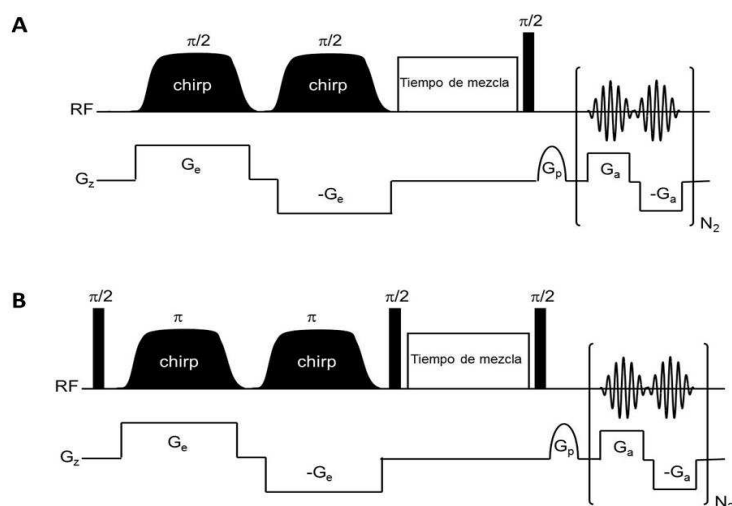


Figura 3.3. Esquemas de las secuencias UF-NOESY (A) modulada en amplitud y (B) de tiempo constante.

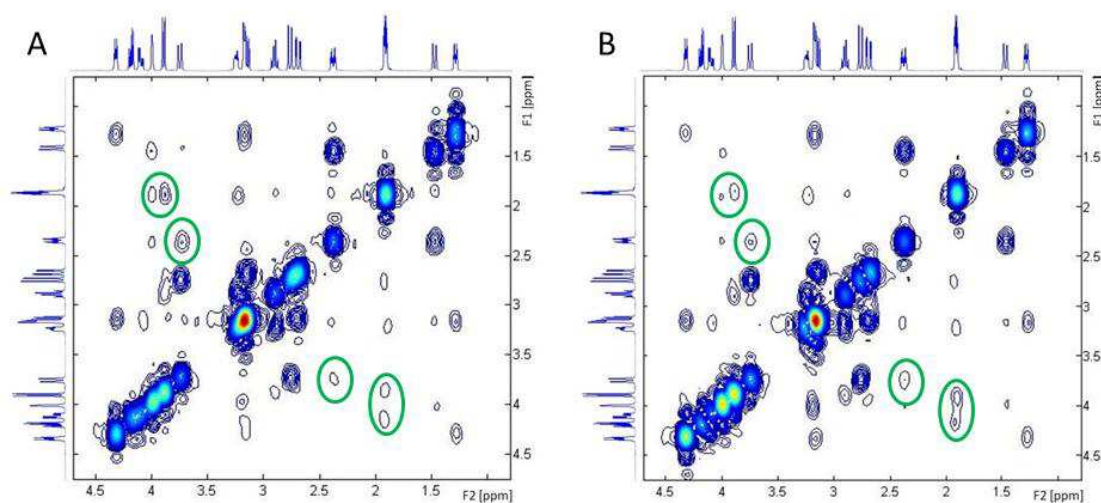


Figura 3.4. Espectros UF-NOESY (A) modulado en amplitud y (B) de tiempo constante, registrados ambos espectros a 500 MHz con una muestra de estricnina 250 mM.

En la figura 3.4.A se muestra el espectro obtenido mediante la secuencia UF-NOESY modulada en amplitud y en 3.4.B mediante la secuencia UF-NOESY de tiempo constante. Ambos espectros se han obtenido con una muestra de estricnina en CDCl_3 250 mM en un espectrómetro de 500 MHz. Los parámetros experimentales de dichos espectros se detallan en el [apartado VI.6.1](#). En la figura se han destacado las señales NOE puras que han permitido verificar que las secuencias diseñadas permiten monitorizar las débiles interacciones dipolares (ver figura 3.2). El tiempo de adquisición de ambos espectros ha sido 1 min 29 s en comparación con el experimento tradicional de la figura 3.2 que requirió 1 h 32 min. El tiempo de mezcla para ambos experimentos UF-NOESY fue de 1.1 s. Este valor se encuentra en concordancia con el valor que se emplea para el registro de espectros con la secuencia NOESY tradicional sin gradientes.

Como se ha comentado en el Capítulo 1 las secuencias UF de tiempo constante dan lugar a espectros con mayor resolución en la dimensión indirecta que las secuencias UF moduladas en amplitud, siempre que el tiempo de codificación sea igual para ambas. Sin embargo, en este caso se observa que el espectro de tiempo constante (figura 3.4.B) posee una ligera pérdida de resolución respecto al espectro modulado en amplitud (figura 3.4.A). Ello se debe a que para el espectro de tiempo constante (3.4.B) se ha empleado un tiempo de codificación que es la mitad del utilizado para la secuencia modulada en amplitud (3.4.A). Esto se ha hecho así para evitar emplear un gradiente de decodificación muy intenso (70%) en el espectro UF-NOESY de tiempo constante, lo cual podría producir pérdidas por difusión en un espectro cuyas señales de correlación son muy débiles.

3.2. Modificaciones a la secuencia UF-NOESY

Como se puede observar en la figura 3.5 en los experimentos NOESY, tanto tradicional pero sobre todo en el ultrarrápido, la señal de la diagonal es muy intensa respecto a las señales de correlación, lo que supone una dificultad para la detección de señales próximas.

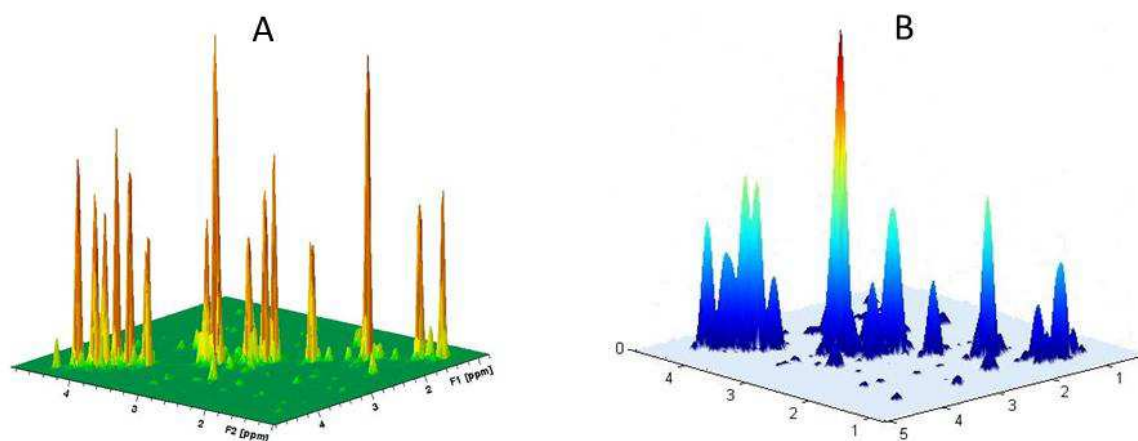


Figura 3.5. Representación tridimensional de espectros NOESY (A) tradicional y (B) ultrarrápido de una muestra de estricnina. Ambos espectros se han registrado a 500 MHz y representado en modo magnitud.

Por esta razón se han planteado dos posibles soluciones para permitir que las señales de correlación puedan detectarse con mayor facilidad.

En el primer caso se ha tratado de reducir la señal de la diagonal. Esto permitiría, por un lado, aumentar la ganancia del receptor del equipo de resonancia durante la adquisición, por lo que se obtendrían señales de correlación de mayor intensidad, y por otro lado, sería posible ajustar mejor el umbral y el número de curvas de utilizado para representar el espectro.

Para conseguir este objetivo se han programado dos secuencias. En la primera al espectro UF-NOESY se le resta, **durante la adquisición**, la señal de un experimento UF-*diagonal* (figura 3.6.A). En la segunda, al espectro UF-NOESY se le resta la señal de un experimento UF-TOCSY (figura 3.6.B). Como la señal del experimento UF-NOESY posee mucha menor intensidad que la señal de los experimentos UF-*diagonal* o UF-TOCSY es necesario adquirir varios *scans* del experimento UF-NOESY para que las señales de la diagonal sean comparables, aunque en ningún caso se consigue eliminar completamente. El número de repeticiones del experimento UF-NOESY y de los experimentos UF-*diagonal* y UF-TOCSY puede ser seleccionado por el usuario independientemente.

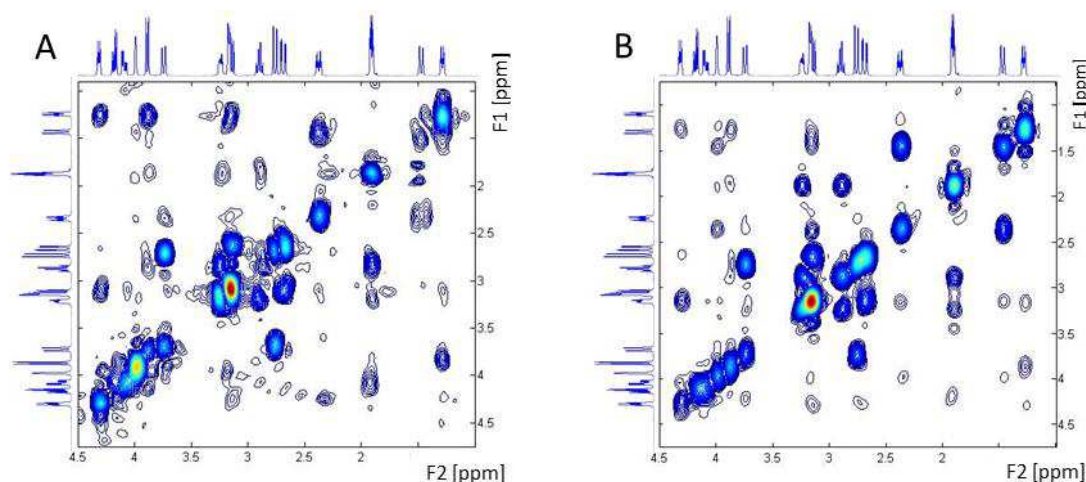


Figura 3.6. (A) Espectro resultante de la diferencia de la repetición de 8 experimentos UF-NOESY y 1 experimento UF-*diagonal*. (B) Espectro resultante de la diferencia de 8 experimentos UF-NOESY y 1 experimento UF-TOCSY. Ambos espectros se han obtenido en un equipo de 500 MHz con una muestra de estricnina 250 mM en CD₃Cl.

En la figura 3.6 se muestra el resultado de los experimentos *diferencia*. En ambos casos se han adquirido 8 *scans* del experimento UF-NOESY y 1 *scan* del experimento UF-*diagonal* (figura 3.6.A) y UF-TOCSY (figura 3.6.B) para que dicha diferencia sea efectiva. Los tiempos de adquisición de ambos experimentos han sido: 1 min 39 s para el espectro en (A) y 1 min 31 s para el espectro en (B). Los parámetros experimentales de los espectros se han detallado en el [apartado VI.6.1](#). Como se puede observar, la sustracción del experimento UF-TOCSY es más efectiva para observar las señales NOE, debido a que parte de la señal sustraída proviene de las señales TOCSY. La efectividad de ambos experimentos se aprecia en las proyecciones tridimensionales de los espectros (figura 3.7). En las dos figuras se observa un aumento de la intensidad de las señales de correlación respecto a la intensidad de la diagonal (figura 3.5).

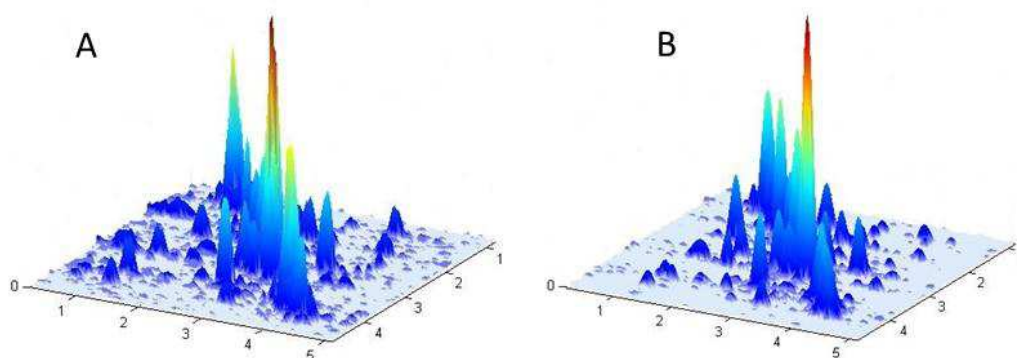


Figura 3.7. Proyecciones tridimensionales de los espectros mostrados en la figura 3.6. (A) Proyección del espectro de la figura 3.6 A. (B) proyección del espectro de la figura 3.6 B.

La aplicación de estas secuencias permite obtener un aumento de la intensidad de las señales de correlación respecto a la señal de la diagonal, por lo que se visualizan mejor. También se puede observar que la señal de la diagonal permanece visible. Es posible sin embargo, restar casi completamente la señal de la diagonal, aumentando el número de *scans* del experimento UF-NOESY, pero al mismo tiempo comienzan a aparecer artefactos en el espectro. Por otro lado, casi siempre resulta conveniente mantener señal en la diagonal ya que sirve de referencia para asignar las señales de correlación. Por esta razón se ha planteado una nueva solución.

3.3. Secuencia UF-ExoNOESY

Otra perspectiva diferente para mejorar la visualización de las débiles señales de correlación dipolar, la constituye la utilización de la denominada *Band-Selective Correlation Spectroscopy*.¹¹⁷ Esta metodología permite la selección de zonas del espectro bidimensional y emplea para ello pulsos selectivos en lugar de pulsos duros. Existen diferentes variantes para su aplicación y con la denominada *ExoCOSY*, escogiendo el tiempo de los pulsos y los *offsets* adecuados, es posible seleccionar cualquier zona del espectro, obteniéndose un espectro COSY de esa zona, fuera de la diagonal, mejorado apreciablemente en cuanto a su resolución.

Con estos precedentes se decidió poner en marcha una nueva secuencia ultrarrápida para la visualización de las correlaciones dipolares. Se la ha denominado UF-ExoNOESY. Con ella sería factible observar, fuera de la diagonal, una zona determinada del espectro, de modo que sea posible eliminar la señal de la diagonal casi completamente, con una sensibilidad superior y sin introducir artefactos en el espectro.

En los equipos de resonancia empleados en el desarrollo de esta Tesis, no están implementadas las secuencias tradicionales *Exo*. Por ello, en primer lugar, se han programado diferentes secuencias *Exo* para disponer de los espectros estándar de referencia y denominado secuencia *ExoNOESY* a la nueva secuencia NOESY de correlación dipolar. El esquema de dicha secuencia tradicional se muestra en la figura 3.8. En ella se sustituyen los pulsos duros de la secuencia tradicional por pulsos selectivos. Escogiendo el tiempo de los pulsos de RF selectivos se establece el ancho espectral, dentro de la ventana del experimento, que se va seleccionar. Mediante el

¹¹⁷ Kupče, E.; Freedman, R. *J. Magn. Reson. A*. **1995**, 112, 134-137.

offset de dichos pulsos se establece la posición de la zona seleccionada dentro de la ventana del experimento.

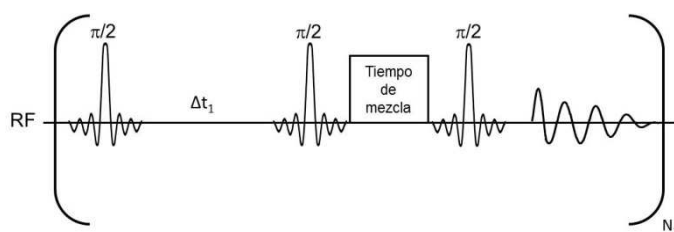


Figura 3.8. Esquema de la secuencia *ExoNOESY* tradicional.

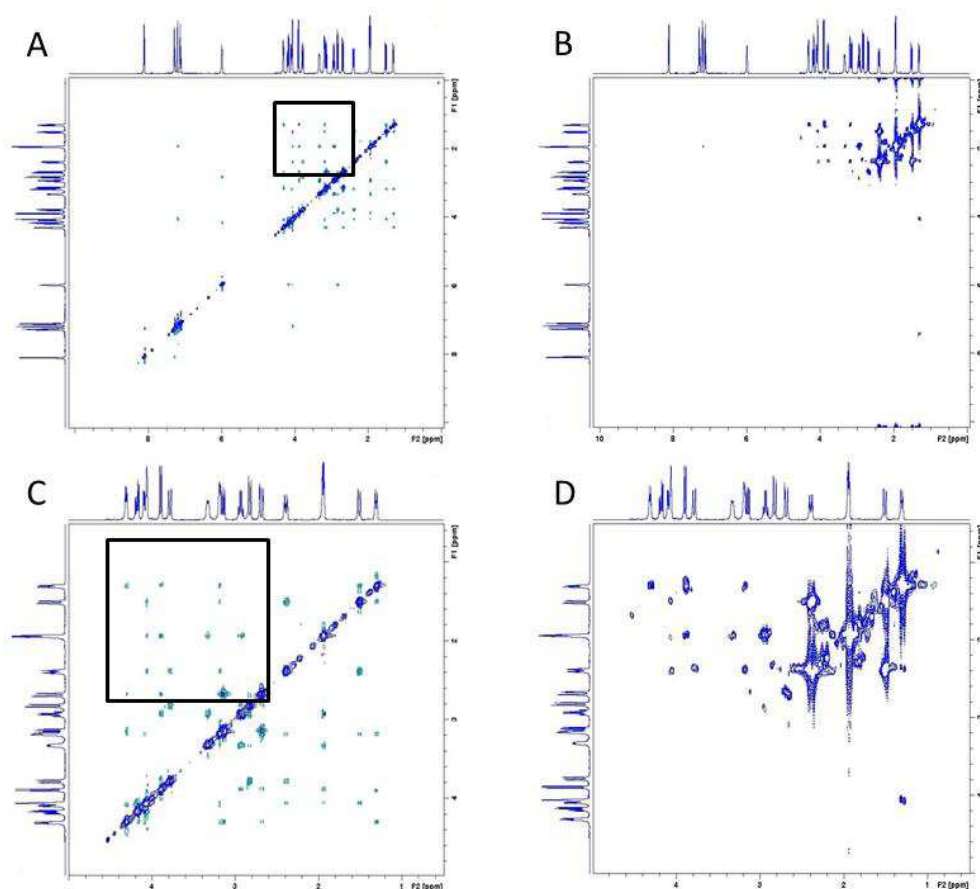


Figura 3.9. (A) Espectro NOESY tradicional de una muestra de estricnina 100 mM a 500 MHz. (B) Espectro *ExoNOESY* de la misma muestra. La zona seleccionada a través de los pulsos selectivos corresponde al área indicada en A mediante el recuadro. C y D corresponden a la ampliación de los espectros en A y B, respectivamente.

En la parte superior izquierda de la figura 3.9 (A) se muestra el experimento NOESY tradicional de una muestra de estricnina 100 mM, adquirido a 500 MHz. De este experimento se ha seleccionado el área incluida en el recuadro para la realización del experimento *ExoNOESY* (3.9.B). Esta área corresponde a un área de 1 ppm en cada dimensión y centrada en 1.8 ppm en F1 y 3.2 ppm en F2. Para ello, en el experimento *ExoNOESY* se han empleado pulsos selectivos *Sneeze*. Estos pulsos han sido seleccionados por dar un perfil de excitación más plano que otros pulsos empleados habitualmente, como los pulsos *gaussianos* o los pulsos con forma de *sinc*. Además,

estos pulsos reducen los artefactos de las señales fuera de la banda seleccionada¹¹⁸. Como se puede observar las señales de correlación situadas en el área seleccionada se observan con claridad a pesar de su cercanía a las señales de la diagonal, que debido a su intensidad son difíciles de eliminar completamente. Esto se observa a pesar de que el tiempo de adquisición del experimento *ExoNOESY* (55 min 35 s) es inferior al tiempo de adquisición del experimento NOESY tradicional (2 h 49 min)

Los parámetros de adquisición de los espectros de la figura 3.9 se han incluido en el [apartado VI.6.2](#).

Es posible extender el concepto del uso de pulsos selectivos para la elección de un área del espectro a la secuencia UF-NOESY, lo que ha dado lugar a la secuencia UF-*ExoNOESY*, cuyo esquema se muestra en la figura 3.10. Esta secuencia se basa en el esquema de la secuencia UF-NOESY de tiempo constante, en la que los pulsos duros se sustituyen por pulsos selectivos. El programa de pulsos para esta secuencia, [ufexonoesyCT.ucm](#), se ha incluido en el Apéndice A.

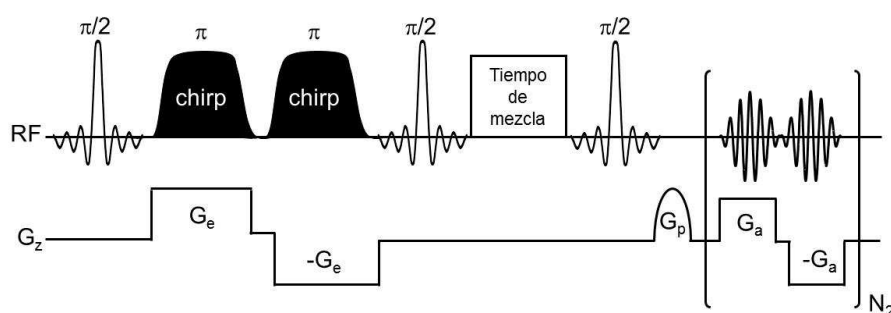


Figura 3.10. Esquema de la secuencia UF-*ExoNOESY*

Empleando esta secuencia se han obtenido espectros UF-*ExoNOESY* en los espectrómetros de 500 y 700 MHz.

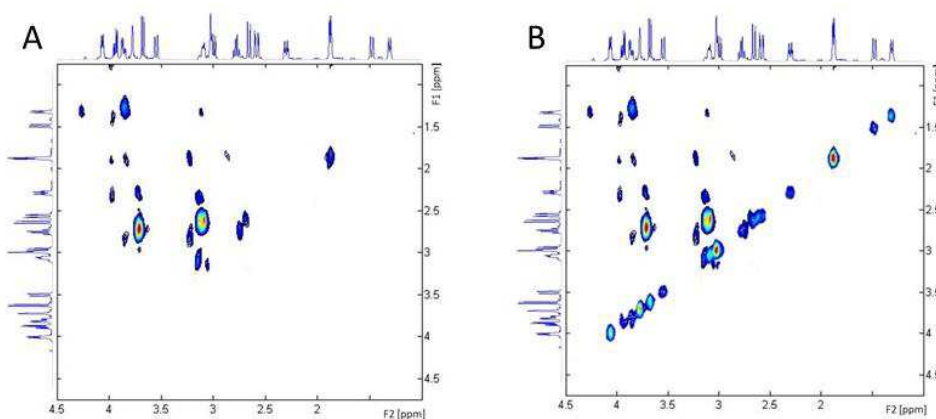


Figura 3.11. (A) Experimento UF-*ExoNOESY* a 500 MHz. (B) Espectro en A al que se ha superpuesto el experimento UF-básico de la misma muestra.

En la figura 3.11 A se muestra el experimento UF-*ExoNOESY* de una muestra de estricnina 300 mM a 500 MHz. En este experimento se han empleado pulsos *Sneeze* para

¹¹⁸ Kupče, E.; Freedman, R. J. *Magn. Reson. A*. **1995**, *112*, 261-264.

seleccionar el área del espectro. En la figura 3.11 B se muestra el mismo espectro que en A pero al que se le ha superpuesto el experimento UF-básico obtenido de la misma muestra. Los parámetros de adquisición de este experimento se detallan en el [apartado VI.6.2.](#)

Se observa cómo las señales de correlación del experimento UF-ExoNOESY se ven con más claridad que en el experimento UF-NOESY correspondiente (figura 3.4 A). Esto es debido al aumento de la intensidad de las señales, ya que los espectros se han adquirido con una ganancia del receptor mayor. Por otro lado, debido a la usencia de las señales intensas de la diagonal, es posible ajustar mejor el umbral y los niveles de las curvas del espectro, de modo que las señales poco intensas se ven mejor. Se ha determinado la relación S/R^{119} de los experimentos UF-ExoNOESY y se ha comparado con sus correspondientes experimentos UF-NOESY y se comprueba que la relación S/R para los experimentos UF-ExoNOESY, 11.56, es superior a la medida en el experimento UF-NOESY, 9.29.

El experimento UF-ExoNOESY a 700 MHz de una muestra de estricnina 300 mM en $CDCl_3$ se muestra en la figura 3.12 A. Se han empleado, de nuevo, pulsos selectivos Sneeze para definir el área. Los parámetros se describen en el [apartado VI.6.2.](#)

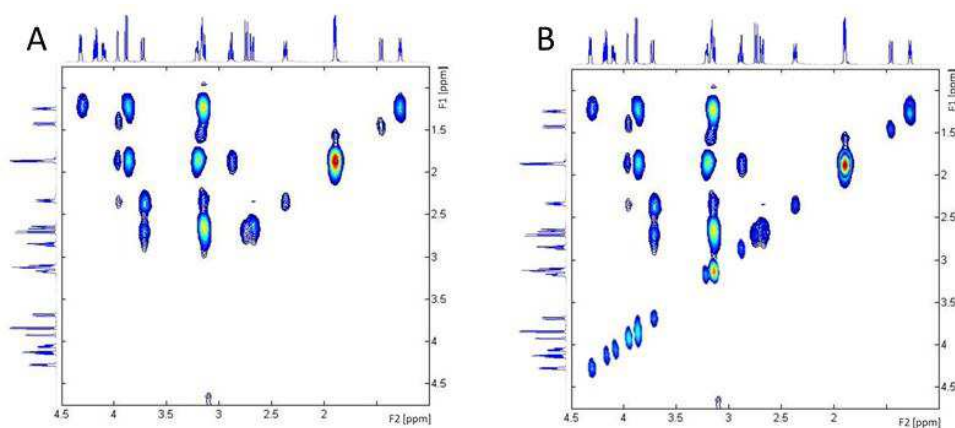


Figura 3.12. (A) Experimento UF-ExoNOESY a 700 MHz. (B) Espectro en A al que se le ha superpuesto el experimento UF-básico de la misma muestra.

La relación S/R medida para el experimento UF-ExoNOESY en el espectrómetro de 700 MHz (40.19) es considerablemente superior a la determinada para el experimento UF-NOESY análogo (8.60). Se observa además que estos valores son superiores a los encontrados en los experimentos adquiridos en el equipo de 500 MHz. Esto se debe al aumento del número de *scans* de los experimentos registrados a 700 MHz y al empleo de una criosonda.

El aumento relativo de las señales de correlación se puede observar con claridad en los gráficos tridimensionales de los espectros de las figuras 3.11 A y 3.11 B y que se muestran en la figura 3.13. Este aumento es muy claro en el experimento adquirido en el espectrómetro de 700 MHz empleando una criosonda TCI.

¹¹⁹ La relación S/R se ha obtenido mediante el cociente: $S/R = \text{señal} / \sqrt{2\text{ruido}}$, donde *señal* es la integral de la intensidad de las señales de interés y *ruido* se ha definido del mismo modo que se especifica en el manual Processing Commands and Parameters del programa TOPSPIN de Bruker..

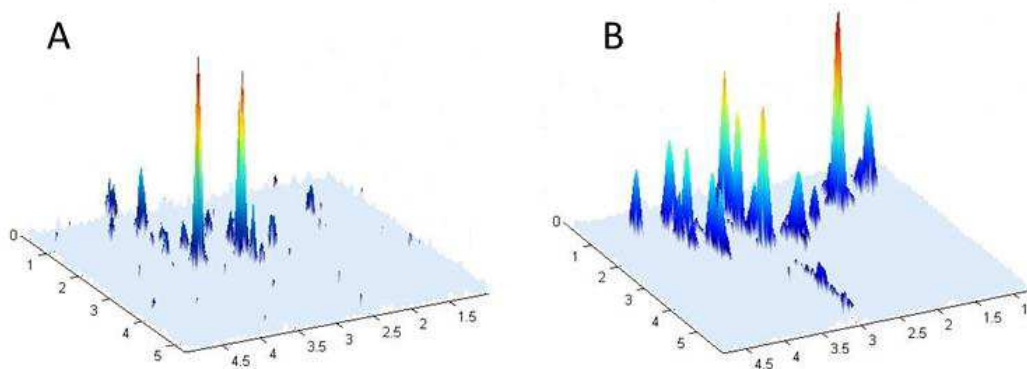


Figura 3.13. Representación tridimensional de espectros UF-ExoNOESY mostrados en (A) la figura 3.11 A y (B) en la figura 3.12 B

En resumen, en el Capítulo 3 se ha abordado por primera vez la detección de interacciones dipolares en fase líquida mediante la metodología de *RMN ultrarrápida*.

- Se han obtenido espectros *UF-NOESY* que muestran con claridad correlaciones dipolares en moléculas patrón, como la estricnina.
- Los espectros *UF-NOESY* presentan el inconveniente de la elevada intensidad de la señal de la diagonal lo que dificulta la detección de las señales de correlación dipolar, mucho más débiles. Con esta finalidad se han desarrollado estrategias que han permitido mejorar la visualización de estas señales.
 - Por un lado se han conseguido resultados satisfactorios a través de la sustracción de la señal *UF-TOCSY* de la señal diagonal del espectro *UF-NOESY*. Ello ha permitido detectar con mayor claridad las débiles señales de correlación dipolar.
 - Paralelamente, se ha desarrollado una nueva secuencia, *UF-ExoNOESY*, basada en la utilización de pulsos selectivos, que ha permitido estudiar áreas concretas del espectro. Como resultado se han obtenido espectros de correlación dipolar de mayor calidad que los espectros obtenidos con la secuencia *UF-NOESY*.

CAPÍTULO 4: NUEVAS ESTRATEGIAS DE PROCESADO DE LOS ESPECTROS DE RMN ULTRARRÁPIDA.

En el capítulo 1 se han mostrado los programas (XprocSS) con los que se realizan las etapas necesarias para obtener un espectro de UF-NMR. Estos programas permiten además, de forma interactiva, llevar a cabo algunos pasos de procesamiento básico. Sin embargo, a veces, a pesar de que es posible obtener un buen espectro escogiendo los parámetros de adquisición óptimos y llevando a cabo este procesamiento básico, los espectros resultantes a no poseen la calidad que cabría esperar. Por esta razón se ha desarrollado un nuevo grupo de programas que permiten la realización de todas las etapas de procesamiento necesarias, de forma interactiva, con lo que se consigue la mejoría del espectro de forma considerable. Estos programas, denominados **XprocUFnmr**, también permiten otras operaciones que ya incorporan los programas comerciales de los espectrómetros de resonancia. Además, se ha desarrollado una herramienta para el procesamiento de los experimentos dinámicos presentados en el capítulo 2. Todos los programas que se presentan se han escrito empleando el programa Matlab 7.11. La ventana interactiva principal del programa XprocUFnmr se muestra en la figura 4.1.

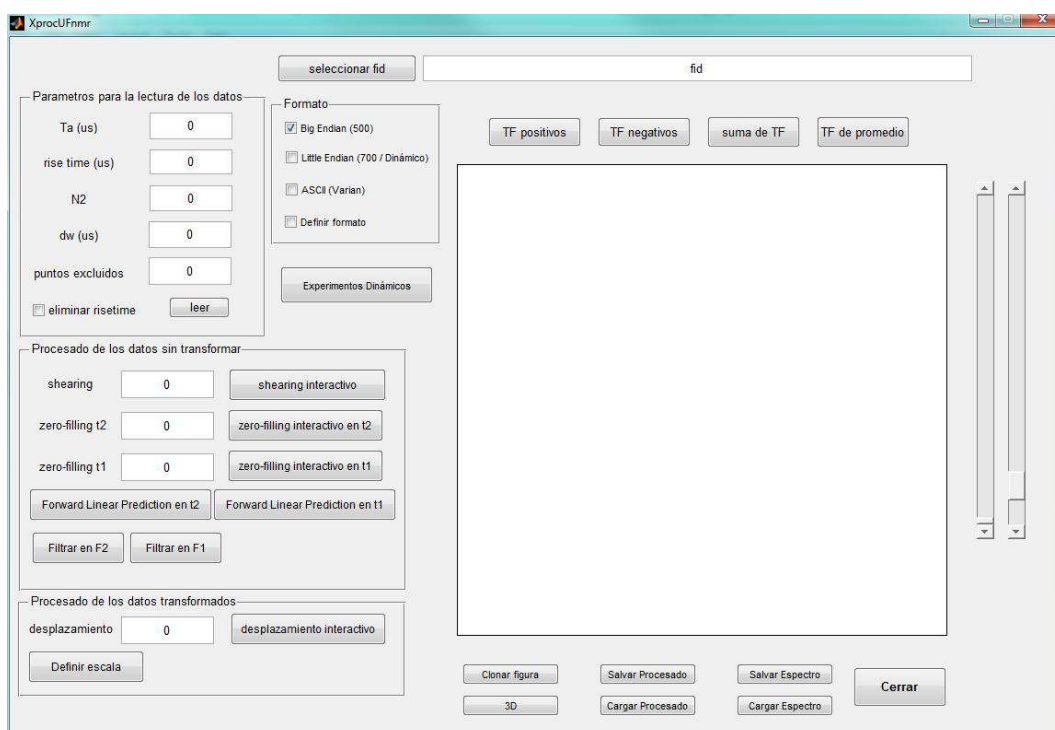


Figura 4.1. Imagen provisional de la ventana principal del programa XprocUFnmr.

4.1. Nuevos programas de tratamiento de datos

Como se puede observar en la imagen 4.1 el nuevo programa es similar al programa anterior al que se le han añadido nuevas utilidades para el procesamiento de los espectros y para facilitar el manejo de los mismos una vez procesados.

Las nuevas utilidades del programa se pueden dividir en cuatro grupos dependiendo de la etapa del proceso de obtención y optimización del espectro en el que se aplican.

4.1.1. Lectura de los datos

En primer lugar se han incorporado nuevas opciones para la lectura de los datos. Como se comentó en el capítulo 1 los programas de procesado, pretenden ser independientes del espectrómetro empleado para la obtención del experimento ultrarrápido, por ello se han incluido opciones para leer datos con diferentes formatos.

La definición del formato se realiza mediante la selección de una de las opciones que aparecen en el grupo **Formato** de la ventana principal del programa. Por defecto aparece seleccionada la opción que lee datos de algunos espectrómetros Bruker. En éstos, el orden de los bytes es *Big Endian*,¹²⁰ es decir, los datos están almacenados como una serie de enteros de 32 bits con formato binario y orden *Big Endian* en la que se alternan los datos reales y los imaginarios.

Mediante la opción "Little Endian" se selecciona la opción para leer datos de los espectrómetros Bruker que emplean el orden *Little Endian* de los datos binarios. Este es el caso de los experimentos adquiridos en el espectrómetro AV700 del CAI de RMN y RSE de la UCM y de los experimentos dinámicos que se han empleado para la monitorización de las reacciones químicas en tiempo real descritas en el capítulo 2.

La opción "ASCII (Varian)" permite leer datos que se han almacenado con formato texto en un espectrómetro Varian. En este caso los datos están almacenados en dos columnas, una para los datos reales y otra para los datos imaginarios.

Cuando se selecciona la opción "Definir formato" aparecerá una ventana que permite seleccionar los diferentes formatos posibles de los datos almacenados (figura 4.2).

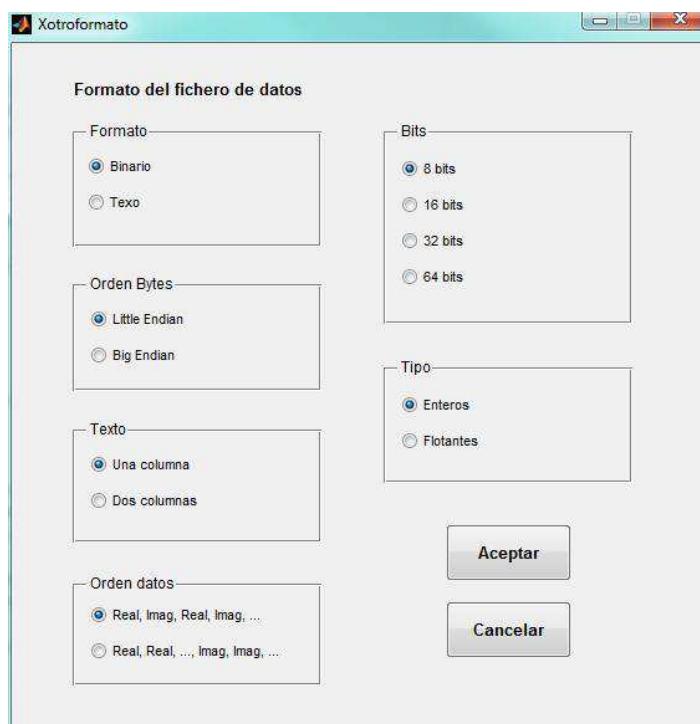


Figura 4.2. Ventana que permite definir el formato de los datos adquiridos en un experimento UF-NMR.

¹²⁰ *Big Endian* y *Little Endian* son términos que describen el orden en el que la secuencia de bytes se almacena en un entero de 4 bytes. *Big Endian* significa que el byte más significativo se almacena primero y *Little Endian* significa que el byte menos significativo se almacena primero. El orden de los bytes está determinado por el ordenador que controla el espectrómetro.

En el caso de las opciones que corresponden a los formatos de los espectrómetros Bruker, las variables de adquisición se obtienen a partir del fichero de parámetros y aparecen automáticamente en la lista para la lectura de los datos. Estos parámetros pueden ser editados antes de que el fichero de los datos sea leído. En el resto de los casos es necesario introducir todos los datos de adquisición para que sea posible leer el fichero de los datos.

4.1.2. Procesado de los datos antes de transformar

Como se ha visto en el capítulo 1 hay algunos pasos que pueden realizarse antes de la transformada de Fourier y que mejoran la resolución del espectro. En el caso del programa presentado en dicho capítulo era posible realizar el ajuste del *shearing* y del llenado con ceros en la dirección t_2 . En este nuevo programa se han incorporado además las opciones del llenado con ceros en la dirección t_1 y la opción de realizar la predicción lineal en ambas direcciones.

La predicción lineal se emplea habitualmente en la RMN tradicional y se basa en la propiedad de la señal muestreada de la FID por la que cada punto de la curva, F_k , está relacionado con los puntos anteriores de la forma:^{121, 122}

$$F_k = \sum_{m=1}^p f_m F_{k-m}$$

donde f_m es el coeficiente de la predicción y es independiente de k por lo que puede determinarse a partir de los datos experimentales. Estos coeficientes pueden emplearse para calcular los valores de la FID no muestreados, lo que permite evitar los artefactos derivados de la obtención del espectro a partir de una FID trunca. Este procedimiento es muy útil en la UF-NMR, especialmente en el dominio directo, ya que el número de puntos adquiridos en esta dirección está definido por el número de gradientes bipolares empleados durante la adquisición. Este número suele ser pequeño, entre 64 y 128, comparado con el número de puntos adquiridos en esta dimensión en la RMN tradicional. Para el cálculo se ha empleado la función *lpc* del programa Matlab que emplea el algoritmo de autorregresión¹²³. El número de coeficientes calculados es igual a la dimensión de los datos antes de transformar en la dirección correspondiente dividido por 2, y el número de puntos predichos igual a dicha dimensión, de modo que se obtiene una matriz con el doble de puntos en esa dimensión

En el caso de la dimensión indirecta, en la que, como se ha visto, la UF-NMR obtiene los datos del espectro ya transformados. Por ello es necesario realizar una transformada de Fourier inversa anterior a la aplicación de la predicción lineal.

En la figura 4.3 se muestra el modo en el que el programa de cálculo de la predicción lineal se aplica a la dimensión directa t_2 .

¹²¹ Led, J. J.; Gesmar, H. *Chem. Rev.* **1991**, 91, 1413-1426.

¹²² Koehl, P. . *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, 34, 257-299.

¹²³ Información acerca de la función y el algoritmo empleado puede encontrarse en la documentación del programa Matlab 7.11.

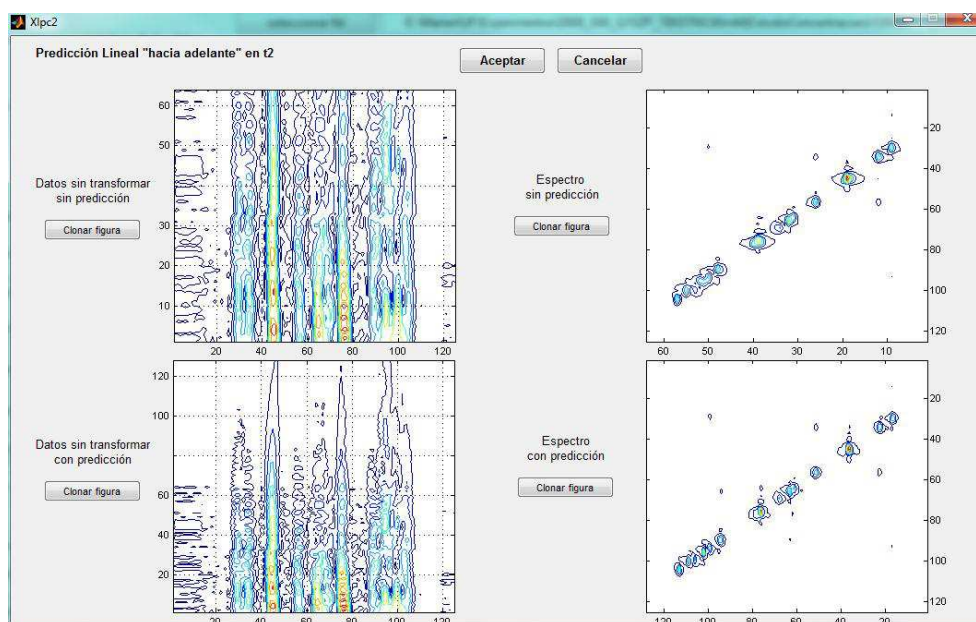


Figura 4.3. Ventana del programa de cálculo de la predicción lineal en la dimensión t_2 .

En la figura se observa como la aplicación de la predicción lineal supone una disminución de los artefactos debido al truncamiento y un aumento de la resolución en el espectro resultante.

Una de los principales problemas que se ha encontrado a lo largo del desarrollo de esta Tesis se debe a que las señales que se obtiene en un espectro de UF-NMR presentan una forma sinc, como se ha comentado en la sección II.3.3.3. Debido a que los espectros se presentan en modo magnitud los lóbulos de dicha forma aparecen alrededor la señal (figura 4.4). En algunos casos se observa además una asimetría, principalmente, en la dimensión indirecta. Es posible minimizar este problema mediante la utilización de filtros que actúan en el dominio del tiempo.

La utilidad principal que se ha incluido en esta parte del programa es la posibilidad de aplicar diferentes filtros en ambas direcciones. Este tipo de funciones de apodización se emplean habitualmente en la RMN tradicional. Permiten dar mayor peso a algunas zonas de la señal en el tiempo, antes de la transformada de Fourier, y en cada caso suponen un aumento de la resolución y/o de la relación S/R del espectro final. Aquellas funciones que dan mayor peso a la parte central y final de la señal en el dominio tiempo, dan lugar a una resolución espectral mejorada debido a que aumentan el tiempo de caída de la señal. Las funciones que proporcionan más peso a la parte inicial, donde la señal es más intensa, producen una mejoría de la relación S/R del espectro. Es necesario encontrar un compromiso, ya que, en general, aquellas funciones que aumentan la resolución del espectro producen una disminución de la relación S/R y viceversa. Por ello el programa de cálculo y aplicación de dichos filtros se ha integrado en una interfaz interactiva en la que el usuario puede ver en tiempo real el resultado del filtro aplicado.

En este caso se han programado diferentes funciones de apodización¹²⁴:

- **Función exponencial:** posibilita el aumento de la sensibilidad y consiste en la función:

¹²⁴ Véase la información contenida en el manual *XWIN-NMR Processing Software Manual*, Bruker Analytik GmbH.

$$f(t) = \exp\left(-\frac{(t-1) \cdot LB \cdot \pi}{2 \cdot SW}\right)$$

donde t es el tiempo, SW es la anchura espectral y LB es una factor que define "el ancho" de la exponencial, que es establecido por el usuario.

- **Función gaussiana:** consiste en la multiplicación de la señal por una función gaussiana y permite mejorar la resolución espectral. Esta función se define como:

$$f(t) = \exp((-at) - (-bt^2))$$

donde t es el tiempo y a y b se definen como:

$$a = LB \cdot \pi$$

$$b = -\frac{a}{2 \cdot GB \cdot t_{aq}}$$

t_{aq} es el tiempo de adquisición y LB y GB miden el ancho y la posición de la función gaussiana y son definidos por el usuario.

- **Función seno:** permite un aumento de la resolución espectral aunque produce una disminución considerable de la sensibilidad. Esta función se define:

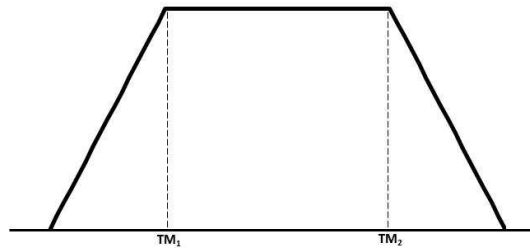
$$f(t) = \text{seno}\left(\frac{(\pi - \varphi)t}{t_{aq}} + \varphi\right)$$

donde t es el tiempo, t_{aq} es el tiempo de adquisición y:

$$\varphi = \frac{\pi}{SSB}$$

SSB está definido por el usuario.

- **Función trapezoidal:** permite eliminar las componentes de alta y/o baja frecuencia de la señal en el tiempo. La forma de dicha función es



Donde TM_1 y TM_2 son establecidos por el usuario

Como se ha comentado anteriormente, estas funciones se aplican a la señal en el tiempo. De nuevo para que puedan emplearse en la dimensión indirecta es necesario realizar la transformada de Fourier inversa de la señal adquirida.

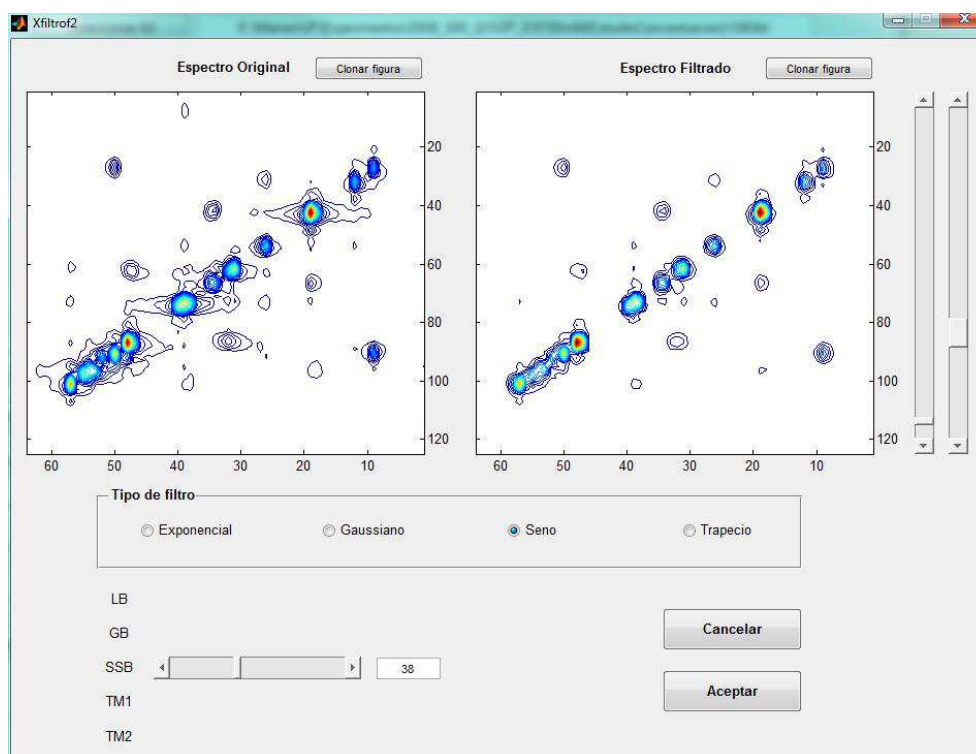


Figura 4.4. Ventana del programa de aplicación de una función de apodización en la dimensión t_2 .

Es importante destacar que el programa de aplicación de las funciones de apodización trabaja de modo interactivo. En el gráfico a la izquierda de la ventana se muestra el espectro original, antes de la aplicación del filtro, y en el gráfico de la derecha el espectro después de la aplicación. Para cualquiera de los diferentes filtros anteriores, las variables que definen dicho filtro, y que se han comentado para cada caso, se fijan de forma interactiva mediante las barras de deslizamiento, al mismo tiempo que se muestra el espectro filtrado con el nuevo valor aplicado. Esto permite establecer más fácilmente cuál es el filtro óptimo para cada caso. En la figura 4.4 se muestra un ejemplo de la ventana de las funciones de apodización en la dimensión directa. Ambos espectros se muestran siempre empleando los mismos niveles del gráfico de contornos. El umbral y el número de niveles para dichos contornos pueden definirse mediante las barras de deslizamiento a la derecha de la ventana. En el ejemplo de la figura se ha aplicado una función seno y se puede observar el aumento de la resolución espectral y sobre todo la disminución de los artefactos de la forma de línea, aunque también una disminución de la relación S/R.

4.1.3. Procesado de los datos transformados

En esta parte del programa, del mismo modo que se hacía en el programa de procesado anterior, es posible definir de forma interactiva el desplazamiento entre los espectros obtenidos a partir de los datos adquiridos durante los gradientes positivos y negativos. Este ajuste es imprescindible para realizar adecuadamente la suma de ambos espectros.

Una herramienta muy útil que se ha incluido en esta parte del programa es la posibilidad de definir y calibrar la escala de frecuencias del espectro. En los espectros de

UF-NMR la dimensión directa, t_2 , se mide del mismo modo que en la RMN tradicional. La diferencia estriba simplemente en que la anchura espectral SW_2 depende del valor del tiempo de adquisición. El centro de la ventana espectral está definido por el *offset* de la ventana del mismo modo que en el experimento tradicional. Por esto, la escala en frecuencias en esta dimensión queda perfectamente definida mediante estas variables y el valor de la frecuencia del núcleo.

Sin embargo, para el dominio indirecto la anchura espectral SW_1 está definida por los parámetros del experimento y el centro de dicha ventana puede desplazarse respecto al valor del *offset* definido por los parámetros tradicionales. Ello se debe a la utilización del pulso *chirp* y del gradiente de purga. Por tanto, en este caso es necesario calibrar la escala de frecuencias en ese dominio. En el caso de los experimentos homonucleares esta calibración puede realizarse empleando las señales de la diagonal, teniendo en cuenta que para dichas señales, las frecuencias en F_2 , que en general estarán bien calibrado, deben coincidir con las frecuencias en F_1 . No obstante, en el caso de los experimentos heteronucleares, es necesario conocer el desplazamiento químico de al menos dos señales para realizar la calibración de la dimensión indirecta. Esta calibración puede emplearse para otros experimentos mediante las opciones para salvar y cargar la escala establecida.

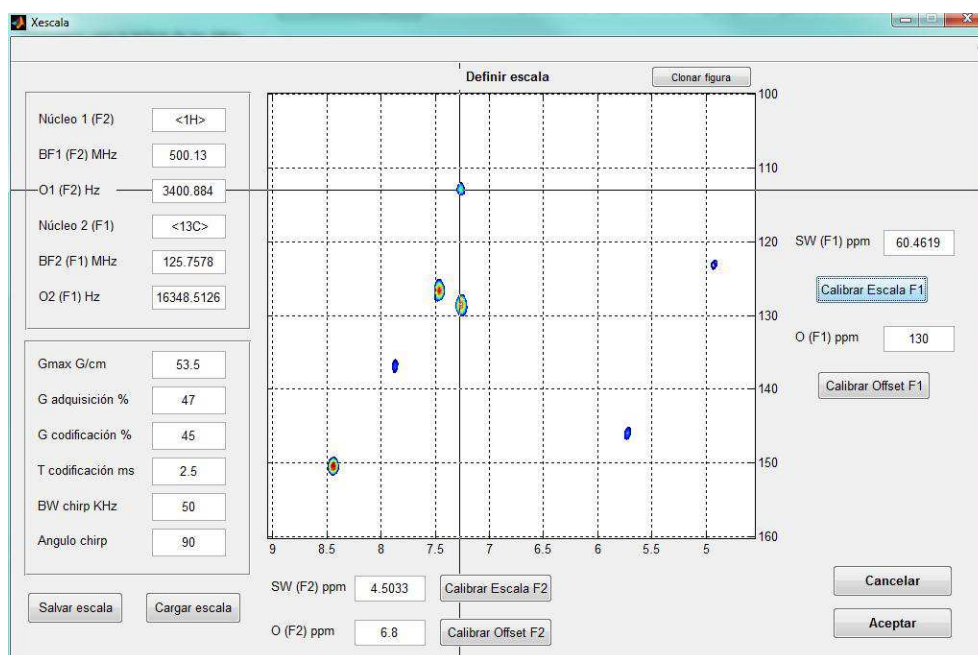


Figura 4.5. Ventana de la utilidad para definir y calibrar la escala en frecuencias de los espectros UF-NMR.

En la figura 4.5 se muestra la ventana principal de la utilidad para definir y calibrar la escala de las frecuencias del experimento. Como se puede comprobar, para poder definir la escala de forma automática es necesario conocer algunos parámetros de adquisición, que ya se han introducido para poder leer el fichero de los datos adquiridos. En el caso de los experimentos registrados con los espectrómetros Bruker, estos valores se obtienen a partir los ficheros de parámetros del experimento. En el caso de experimentos de otros espectrómetros o con otros formatos, es necesario que el usuario suministre estos valores al programa que define la escala.

4.1.4. Otras utilidades

Además de las posibilidades de procesamiento del espectro se han incluido otras utilidades que permiten salvar o visualizar el espectro final y los pasos intermedios.

En todos los pasos del procesamiento del espectro es posible obtener una figura con el gráfico que se muestra en pantalla en ese momento. Esto es posible seleccionando la opción "Clonar figura" de cada una de las ventanas. Esto genera una figura de Matlab. Es posible editar esta figura para modificar los límites de los ejes, el tamaño de la figura, el mapa de color, etc. y además, es posible salvarla con diferentes formatos de imagen.

Por otro lado se han incluido opciones para mostrar el espectro en un gráfico tridimensional, para salvar los pasos seguidos en el procesamiento de un espectro, que pueda ser empleado posteriormente en el procesamiento del mismo o de otro espectro. También se pueden salvar los datos del espectro, que puede volver a ser recuperado con el programa.

4.2. Nuevas herramientas para la monitorización de sistemas dinámicos

Finalmente, se ha desarrollado una nueva utilidad para procesar los espectros de los estudios dinámicos. Esta utilidad permite procesar todos los espectros del estudio dinámico tomando como modelo un espectro transformado con el programa XprocUFnmr. Los espectros así transformados se presentan como una secuencia de video.

La secuencia de espectros generada de este modo se puede exportar a un fichero de video AVI. Esta utilidad para procesar los espectros dinámicos se ha incorporado al programa principal XprocUFnmr.

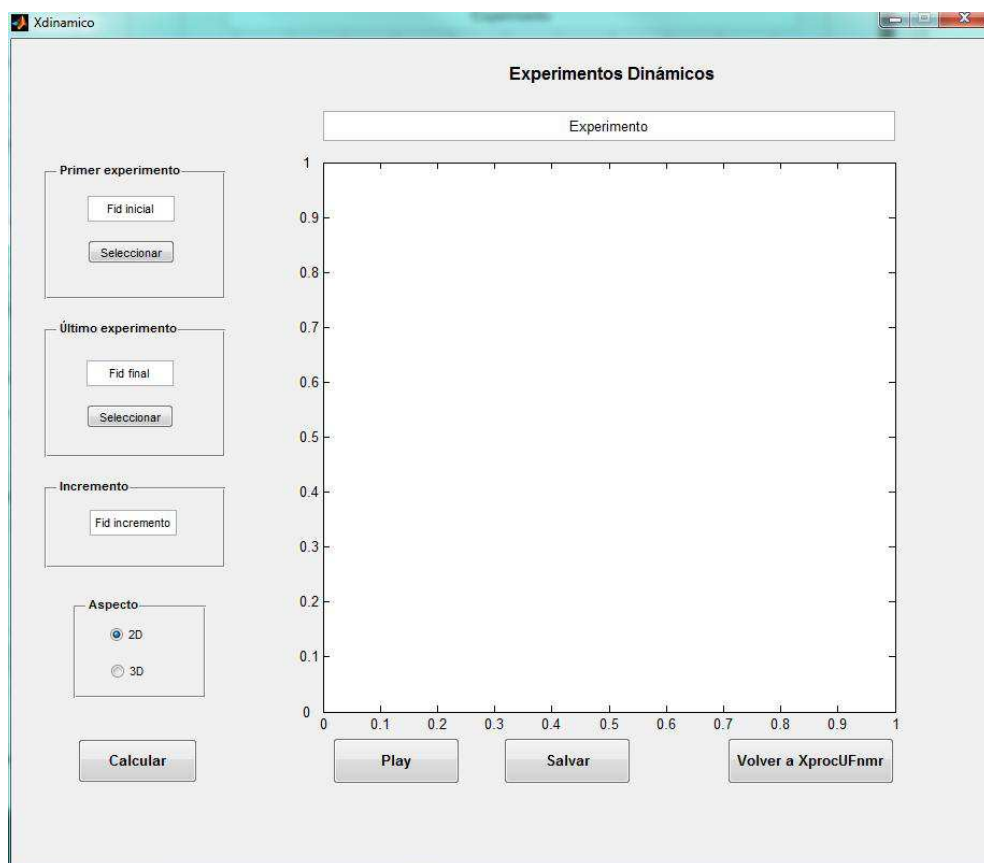


Figura 4.6. Ventana de la utilidad de procesado de los experimentos dinámicos de UF-NMR.

Los programas presentados en esta memoria han sido desarrollados como repuesta a la necesidad de disponer de una herramienta para procesar los experimentos de RMN ultrarrápida. Esta es la razón por la que de un programa sencillo, XprocSS, se ha pasado al programa XprocUFnmr que incorpora múltiples herramientas para la optimización y manejo de los espectros de UF-NMR. Por ello, es un programa que está en continuo desarrollo y que seguirá incorporando nuevas herramientas en respuesta a las necesidades planteadas.

El resumen de los resultados obtenidos en el Capítulo 4 se recoge seguidamente en el apartado V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

Conclusiones

El presente trabajo aborda la puesta en marcha en la UCM de la metodología de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional ultrarrápida. A través de esta técnica se pueden ir superando los problemas derivados de los largos tiempos de adquisición que presenta la Resonancia Magnética Nuclear bidimensional tradicional. La memoria que se presenta pretende acercar esta novedosa y prometedora técnica, aunque compleja de aplicación, al investigador. Todo ello persigue como objetivo final la aplicación de la RMN al estudio de sistemas dinámicos en tiempo real.

En el Capítulo 1 se ha abordado la realización del experimento básico de *RMN ultrarrápida* (experimento diagonal). Ello ha implicado los siguientes aspectos concretos:

- Desarrollo de un programa interactivo para el cálculo de los parámetros de adquisición de los experimentos de *RMN ultrarrápida*. Este programa es independiente del equipo de resonancia, del programa de adquisición y del ordenador empleado. Se ha escrito en el lenguaje de programación *Matlab* que es compatible con diferentes plataformas. Los parámetros de adquisición así calculados se pueden “trasladar” fácilmente a la lista de parámetros de adquisición de cada sistema.
- Un nuevo programa para la obtención del espectro *ultrarrápido* a partir de los parámetros de adquisición calculados, puesto que esta operación no puede realizarse del mismo modo que en los espectros tradicionales. El programa permite además el procesamiento de los datos para la optimización de dicho espectro y que puede ejecutarse en cualquier estación de trabajo independientemente del espectrómetro en el que se hayan adquirido los datos.
- Se ha generado el programa de pulsos para la realización del experimento básico 2D de *RMN ultrarrápida*. El proceso se ha aplicado con éxito para espectrómetros de 500 MHz con un equipamiento estándar y de 700 MHz con una criosonda TCI.
- Se han estudiado diferentes secuencias para la codificación espacial, modulada en amplitud, de tiempo constante, modulada en fase y modulada en amplitud *first-in-first-out*, y los parámetros de dichas esquemas, estableciéndose las condiciones óptimas de aplicación para cada uno de ellos.

En el Capítulo 2 se ha abordado la realización de los experimentos de UF-NMR homo y heteronucleares de correlación escalar y su aplicación al estudio de sistemas dinámicos en tiempo real. Para ello:

- Se han desarrollado nuevos programas de pulsos para la realización de los experimentos de correlación homonuclear *UF-TOCSY* y *UF-COSY* modulados en amplitud y de tiempo constante y heteronuclear *UF-HSQC* y *UF-HMBC* para los núcleos de ^{13}C , ^{15}N y ^{31}P .
- Se han optimizado los parámetros de todas las secuencias desarrolladas para obtener la relación S/R y la resolución óptimas en cada caso, con el objetivo de aplicar las diferentes secuencias al estudio de sistemas dinámicos en tiempo real en el interior del imán.

- Utilizando la secuencia *UF-TOCSY* se ha realizado el seguimiento de la reacción entre la 3-pentanona y el Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 . La reacción se ha llevado a cabo en un equipo estándar de RMN de 500 MHz en el interior de un tubo de resonancia de 5 mm. Se han registrado 525 espectros 2D *UF-TOCSY* en un tiempo de 87.53 min, a partir de los cuales se puede seguir el transcurso de la reacción, detectar la aparición de intermedios y productos, así como la obtención de datos cinéticos.
- Se ha aplicado por primera vez la secuencia *UF-HMBC* en el estudio dinámico de una reacción orgánica análoga a la anterior. A través de las correlaciones heteronucleares detectadas en los 438 espectros *HMBC* obtenidos en 112 min, se ha podido monitorizar la evolución del centro reactivo (carbono carbonílico) a lo largo de la reacción. La secuencia permite la detección de las diferentes especies participantes en el proceso (reactivos, intermedios y productos).
- Se ha empleado por primera una secuencia ultrarrápida combinada de correlación homo/heteronuclear (*UF-TOCSY/HMBC*). La sinergia de ambas correlaciones aporta una información completa sobre la evolución del sistema dinámico. Los resultados permiten aportar datos simultáneos de ambas correlaciones empleando para ello un equipo estándar de RMN con un único gradiente en la dirección Z y un único canal de recepción.

En el Capítulo 3 se ha abordado por primera vez la detección de interacciones dipolares en fase líquida mediante la metodología de *RMN ultrarrápida*.

- Se han obtenido espectros *UF-NOESY* que muestran con claridad correlaciones dipolares en moléculas patrón, como la estricnina.
- Los espectros *UF-NOESY* presentan el inconveniente de la elevada intensidad de la señal de la diagonal lo que dificulta la detección de las señales de correlación dipolar, mucho más débiles. Con esta finalidad se han desarrollado estrategias que han permitido mejorar la visualización de estas señales.
 - Por un lado se han conseguido resultados satisfactorios a través de la sustracción de la señal *UF-TOCSY* de la señal diagonal del espectro *UF-NOESY*. Ello ha permitido detectar con mayor claridad las débiles señales de correlación dipolar.
 - Paralelamente, se ha desarrollado una nueva secuencia, *UF-ExoNOESY*, basada en la utilización de pulsos selectivos, que ha permitido estudiar áreas concretas del espectro. Como resultado se han obtenido espectros de correlación dipolar de mayor calidad que los espectros obtenidos con la secuencia *UF-NOESY*.

En el Capítulo 4 se presentan nuevos programas que permiten la obtención y la optimización del espectro de RMN ultrarrápida, ya que implican una mejoría apreciable en las posibilidades de tratamiento de los datos obtenidos. Estos programas se han integrado en una única interfaz gráfica que permite trabajar con comodidad con esta herramienta, incluso para usuarios con escasa experiencia en la utilización de esta metodología. De esta forma se pueden realizar fácilmente las siguientes operaciones:

- Corrección denominada *shearing*, que compensa las imperfecciones existentes entre los gradientes positivos y negativos, tratamiento mediante llenado con ceros en ambas dimensiones y la predicción lineal de la dimensión directa. Con esta última herramienta se obtienen espectros cuyas señales presentan un menor número de artefactos que con la primera. Seguidamente se realiza la transformada de Fourier que da lugar al espectro 2D de *UF-NMR*.
- Posterior a la aplicación de la transformada de Fourier es posible realizar la corrección del desplazamiento entre los espectros obtenidos con los datos adquiridos durante los gradientes positivos y negativos, imprescindible para la suma de ambos espectros. Además, ahora es posible la aplicación de diferentes filtros en ambas dimensiones y especialmente útil es la herramienta del programa que permite establecer y calibrar la escala de ambos ejes.
- Debido a que los experimentos de *UF-NMR* son apropiados para el estudio de sistemas en tiempo real se ha incorporado al programa una utilidad que permite procesar los espectros adquiridos en este tipo de experimentos. Esta utilidad procesa todos los espectros provenientes de las secuencias de *UF-NMR* dinámicas según los pasos definidos por el usuario y muestra todos los espectros resultantes en forma de película, siendo posible salvar la secuencia en formato de video.

Las conclusiones presentadas en esta Tesis son el resultado de intentar acercar y aplicar las prometedoras posibilidades analíticas a las que se puede acceder mediante la *RMN ultrarrápida*.

VI. PARTE EXPERIMENTAL

VI.1. Aspectos generales

Para la programación de las formas de los pulsos chirp se ha empleado la utilidad *ShapeTool* del programa TOPSPIN de Bruker. Una vez abierta la utilidad se selecciona la forma de pulso adiabático *SmoothedChirp*. Se han introducido los valores de los parámetros *Total Sweep-Width [Hz]* y *Length of Pulse [usec]* deseados para dicho pulso. El parámetro *Total Sweep-Width [Hz]* corresponde al ancho de banda seleccionado para el pulso *chirp* y *Length of Pulse [usec]* corresponde a la longitud del pulso en μs . El parámetro *Size shape* se refiere al número de puntos que definen la amplitud y la fase del pulso. Se ha seleccionado siempre un número de puntos de modo que la resolución con la que se define el pulso sea de $1 \mu\text{s}$. En todos los casos se ha definido un suavizado del 10% mediante el parámetro *% to be smoothed*. Finalmente es necesario activar el parámetro *Low to high Field* en la mayoría de los casos para que el barrido se realice desde valores de campo más bajos a valores más altos. De este modo el barrido del pulso se realizará desde la parte inferior de la muestra a la parte superior cuando el primer gradiente del esquema de la codificación espacial es positivo y el segundo es negativo. Únicamente en los casos de los pulsos empleados en el esquema de codificación *first-in-first-out* (ver [sección 1.5](#)) se han generados pulsos que realizan el barrido desde campos más altos a campos más bajos.

Una vez definidos los parámetros, se salva la forma del pulso. Es en este momento cuando se define el ángulo de rotación del pulso y el tipo de rotación (*Excitation, Inversion, Refocussing* and *Norotation*). Para los experimentos modulados en amplitud, el ángulo de rotación debe ser 90° y el tipo de rotación *Excitation*. Para los pulsos de los experimentos de tiempo constante, el ángulo de rotación es 180° y el tipo de rotación *Refocussing*.

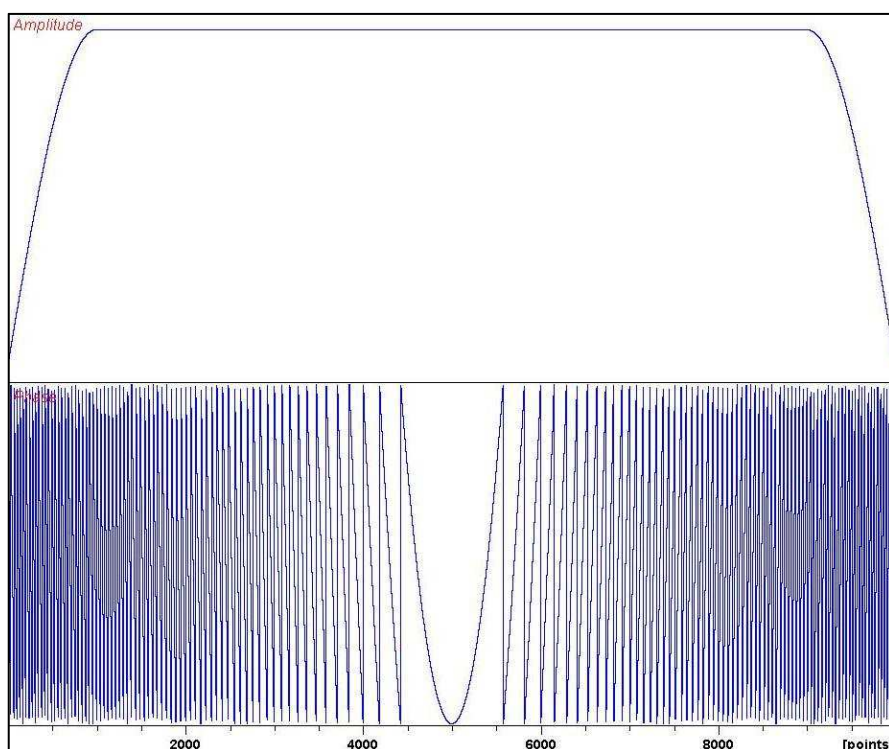


Figura VI.1. Gráfico de la amplitud y la fase del pulso *chirp* de 90° de excitación de 60 kHz de ancho de banda y 10 ms de longitud definido con una resolución de $10 \mu\text{s}$.

En la figura VI.1 se muestra el gráfico de la amplitud y la fase para el pulso *chirp* de 90° de excitación de ancho de banda 60 kHz y longitud 10 ms cuyo forma se define en el fichero [Chirp 60k 10ms 90excitacion](#) incluido en el Apéndice A.

En el caso de pulsos *chirp* de 90° de excitación se ha empleado la utilidad *Integrate Shape* del programa *Shape Tool* para obtener un valor aproximado de la potencia necesaria para que cada pulso concreto realice la rotación de 90°. Este valor sirve como punto de partida y posteriormente debe ser ajustado para conseguir el valor exacto de la potencia del pulso. En el caso de pulsos del núcleo ^1H , este ajuste se ha realizado mediante una secuencia 1D, que utiliza dicho pulso como pulso de excitación. El valor óptimo será aquel con el que se obtiene la señal más intensa. En el caso de otros núcleos, el ajuste de la potencia del pulso se ha realizado empleando la secuencia 2D de UF-NMR correspondiente. De nuevo, el pulso de 90° corresponderá a aquel pulso que produce la máxima intensidad de la señal.

En el caso de los pulsos de 180° se ha obtenido un valor aproximado mediante la utilidad *Integrate Adiabatic Shape*. En este caso el ajuste final de la potencia del pulso es un poco más complicado ya que estos pulsos producen un reenfoque de la señal en un rango más amplio de potencia, aunque el pulso de 180° corresponderá a aquel que produce mayor intensidad de señal y el menor número de artefactos en el espectro. En todos los casos este ajuste se realizó mediante la propia secuencia de UF-NMR.

El valor de la potencia calculado para cada pulso y núcleo es válido para todos los experimentos que empleen dicho pulso sobre dicho núcleo.

Aunque en el Capítulo 1 se han detallado los pasos necesarios para la realización de un experimento UF-NMR es necesario comentar aquí otros parámetros necesarios para conseguir el ajuste final del experimento.

Como se ha comentado, la dirección directa se adquiere del mismo modo que los experimentos tradicionales, por lo que el *offset* de la ventana espectral en esta dirección se define del mismo modo que en la RMN convencional, mediante el parámetro correspondiente del *offset* del canal usado para dicha dimensión, y su valor será igual a $SW_2/2$. En los casos en los que se ha realizado la eliminación de alguna señal, la frecuencia correspondiente a dicha señal se ha definido independiente al valor del centro de la ventana. En el caso de los espectrómetros empleados en el desarrollo de esta Tesis, se han definido mediante una lista de frecuencia, que consiste en un fichero en el que se almacena el valor de dicha frecuencia.

El *offset* de la ventana en el dominio indirecto, que no se codifica del mismo modo que en la RMN tradicional, se ha definido mediante el *offset* de los pulsos *chirp* que codifican esa dimensión, y que debe ser igual a $\pm SW_1/2$, donde el signo depende de si la codificación se hace desde campos más bajos a campos más altos o al revés.

En todos los experimentos que se presentan en esta Tesis se ha empleado un gradiente de purga anterior a la adquisición para eliminar la señal que proviene de magnetización que no ha sido codificada. Esta señal aparece en $\nu_1 = 0$, es decir, si observamos los datos adquiridos durante el primer gradiente vemos un señal intensa en los primeros puntos adquiridos. Esta señal puede distinguirse de la señales del espectro porque al modificar el *offset* del pulso *chirp*, cuyo efecto es desplazar la ventana del espectro, la señal no se desplaza. Si se transforma un espectro así adquirido se observa un artefacto intenso en el límite de las frecuencias más bajas del espectro y que no

desaparece al modificar el offset del pulso de codificación. Para evitar este artefacto hay que aumentar el valor del gradiente de purga. El gradiente de purga produce también un desplazamiento de la ventana en la dirección F1. Por esto, cada vez que se modifica el valor del gradiente de purga es necesario reajustar el valor del *offset* del pulso *chirp* para centrar de nuevo la ventana de adquisición en la dirección indirecta. El *offset* inducido por dicho gradiente de purga es $\Delta O_p = \gamma_p G_p T_p / 2\pi C$, donde G_p y T_p son la intensidad y el tiempo de aplicación de dicho gradiente y C la constante que relaciona el tiempo en la dimensión indirecta con la posición de los espines en la muestra ($t_1 = C \cdot z$) y que para el esquema modulado en amplitud es $C = t_1^{max} / L$ y para el esquema de tiempo constante $C = 2t_1^{max} / L$.

Los valores de las anchuras espectrales de la dimensión indirecta de los experimentos UF-NMR, que se describen más adelante, se refieren a los valores reales. Éstos se obtienen mediante la calibración del eje en esta dimensión y no siempre coincide con el valor de SW_1 calculado a partir de los parámetros de la secuencia ([tabla II.1](#)). Esto se debe a las imperfecciones de dichos parámetros, principalmente del valor de los gradientes aplicados durante la codificación espacial y la adquisición de los datos.

VI.2. Espectro básico de UF-NMR

Para la obtención del espectro básico mostrado en la [figura 1.14](#) se ha empleado una muestra de estricnina 100 mM en $CDCl_3$ y un equipo de 500 MHz. El espectro se obtuvo mediante una secuencia de codificación modulada en amplitud. El ancho de banda del pulso *chirp* fue de 60 kHz y su duración 10 ms. La intensidad del gradiente aplicado durante la codificación fue de 8 G/cm. La duración e intensidad de los gradientes durante la adquisición fue de 25.7 G/cm y 250 μ s. Se realizaron en total 64 pasos de la secuencia EPSI de decodificación. Previo a la adquisición se aplicó un gradiente sinusoidal de purga de 10.7 G/cm durante 200 μ s. Con estos parámetros las anchuras espectrales en ambas dimensiones fueron de 4 ppm aproximadamente. El espectro se obtuvo en un único *scan* en un tiempo total de 0.052 s. Para la obtención del espectro, previo a la aplicación de la transformada de Fourier, se ha realizado un llenado con ceros en la dimensión t_2 . En la figura 1.14 se muestra el espectro procedente de los datos adquiridos durante los gradientes de codificación positivos.

El espectro básico de la [figura 1.15](#) se ha registrado utilizando una muestra de estricnina 40 mM en $CDCl_3$ y un espectrómetro de 700 MHz. Se han empleado pulsos *chirp* de 5 ms de duración y ancho de banda de 60 kHz. La intensidad de los gradientes aplicados durante la codificación espacial fue de 8 G/cm y la del gradiente empleado durante la adquisición fue de 26.75 G/cm, con una duración de 0.148 ms. El tiempo establecido para la desconexión de los gradientes fue de 30 μ s. Las anchuras espectrales fueron $SW_2=4$ ppm y $SW_1=4.25$ ppm. El tiempo total del experimento fue de 0.033 s. Para la obtención del espectro se ha llevado a cabo un llenado con ceros de hasta 3 veces el número de puntos original. En este caso no se ha sido necesario aplicar estrategia alguna para compensar los desequilibrios entre gradientes positivos y negativos, ni durante la adquisición ni durante el procesado. El espectro que se muestra se ha obtenido haciendo uso de los datos adquiridos mediante los gradientes positivos.

Los espectros mostrados en la [figura 1.16](#) se han obtenido a partir de una muestra de estricnina 80 mM en $CDCl_3$ y un equipo de 500 MHz. Los parámetros de

adquisición de los espectros de la figura fueron de: (A) secuencia UF básica modulada en amplitud, $\Delta\Omega_{\text{RF}}=50$ kHz, $t_1^{\text{max}}=20$ ms, $G_e=6.4$ G/cm, $T_a=250$ μ s, $N_2=64$, $G_a=24$ G/cm. Se ha aplicado un gradiente de purga sinusoidal de 13.4 G/cm durante 200 μ s. El espectro corresponde al obtenido a partir de los datos adquiridos con los gradientes de decodificación positivos. Las anchuras espectrales obtenidas fueron $SW_2=4$ ppm y $SW_1=4.7$ ppm. (B) secuencia UF básica de tiempo constante, $\Delta\Omega_{\text{RF}}=60$ kHz, $t_1^{\text{ma}}=10$ ms, $G_e=8$ G/cm, $T_a=250$ μ s, $N_2=64$, $G_a=26.8$ G/cm. Se ha aplicado un gradiente de purga sinusoidal de 13.4 G/cm durante 200 μ s. El espectro corresponde al obtenido a partir de los datos adquiridos con los gradientes de decodificación positivos. Las anchuras espectrales obtenidas fueron $SW_2=4$ ppm y $SW_1=5.1$ ppm. (C) secuencia UF básica modulada en amplitud *first-in-first-out*, $\Delta\Omega_{\text{RF}}=60$ kHz, $t_1^{\text{max}}=20$ ms, $G_e=3.7$ G/cm, $T_a=250$ μ s, $N_2=64$, $G_a=13.4$ G/cm. Durante la codificación espacial se han aplicado dos gradientes bipolares de 2.5 ms y 10.7 G/cm. Previo a la adquisición se ha aplicado un gradiente de purga sinusoidal de 16 G/cm durante 200 μ s. El espectro corresponde al obtenido a partir de los datos adquiridos con los gradientes de decodificación positivos. Las anchuras espectrales obtenidas fueron $SW_2=4$ ppm y $SW_1=5.4$ ppm. Todos los experimentos se han realizado en un único barrido y los tiempos de adquisición fueron (A) 0.052 s, (B) 0.042 s y (C) 0.057 s. En todos los casos (A), (B) y (C), previo a la aplicación de la transformada de Fourier, se ha realizado un ajuste del *shearing* y un llenado con ceros de la dimensión t_2 .

En la [figura 1.17](#) se muestran los datos obtenidos antes de transformar los experimentos básicos modulados en amplitud realizados mediante un único *scan*, una muestra de estricnina 100 mM en CDCl_3 y un espectrómetro de 500 MHz. Para los tres experimentos se ha empleado los siguientes parámetros: $\Delta\Omega_{\text{RF}}=60$ kHz, $G_e=8$ G/cm, $T_a=250$ μ s, $N_2=64$. Para el experimento de la figura 1.17 A $t_1^{\text{max}}=10$ ms y $G_a=13.4$ G/cm; figura 1.17B: $t_1^{\text{max}}=20$ ms y $G_a=25.7$ G/cm y la figura 1.17 C: $t_1^{\text{max}}=40$ ms y $G_a=48.15$ G/cm. Las anchuras espectrales fueron $SW_2=4$ ppm y $SW_1=4$ ppm aproximadamente. El gradiente de purga previo a la adquisición fue de 13.4 G/cm durante 200 μ s. Los tiempos de adquisición fueron en (A) 0.042 s, en (B) 0.052 s y en (C) 0.072 s.

Los espectros básicos de la [figura 1.18](#) se han obtenido con una muestra de estricnina 80 mM, en CDCl_3 , un espectrómetro de 500 MHz y empleando una secuencia UF básica modulada en amplitud. En el experimento de la izquierda (A) el ancho de banda del pulso *chirp* fue de $\Delta\Omega_{\text{RF}}=50$ kHz y para el experimento en (B) $\Delta\Omega_{\text{RF}}=60$ kHz. En ambos experimentos se han empleado los siguientes parámetros: $t_1^{\text{max}}=10$ ms, $G_e=7$ G/cm, $T_a=178$ μ s, $N_2=64$, $G_a=29.4$ G/cm. Para leer correctamente los datos ha sido necesario excluir los primeros 134 puntos almacenados en los ficheros. En la obtención de los espectros se ha realizado un llenado con ceros previo a la transformada de Fourier. Se ha corregido el desplazamiento entre los espectros obtenidos con los datos adquiridos durante los gradientes positivos y negativos y realizado la suma de ambos espectros. Las anchuras espectrales obtenidas fueron: (A) $SW_2=4$ ppm y $SW_1=5.4$ ppm, (B) $SW_2=4$ ppm y $SW_1=6.65$ ppm. El tiempo de experimentación de ambos experimentos fue 0.033 s.

Los experimentos básicos mostrados en la [figura 1.19](#) se han obtenido a partir de una muestra de estricnina 100 mM, en un equipo de 500 MHz, utilizando secuencias de UF-NMR básicas moduladas en amplitud. Para los espectros (A) y (B) se emplearon los siguientes parámetros: $\Delta\Omega_{\text{RF}}=60$ kHz, $t_1^{\text{max}}=20$ ms, $G_e=8$ G/cm, $T_a=210$ μ s, $N_2=64$, G_a

=25.7 G/cm. En la obtención del espectro en (A) no se ha realizado llenado con ceros antes de la transformada de Fourier, mientras que para el espectro en (B) se ha realizado un llenado con ceros en el dominio directo, t_2 , de modo que el número de puntos resultantes sea 128, es decir, el doble de los puntos adquiridos. En el espectro en (C) se adquirieron 128 puntos en la dirección t_2 . En este caso no se realizó un llenado con ceros previo a la realización de la transformada de Fourier. Los tres corresponden a los espectros obtenidos al transformar los datos adquiridos durante el gradiente positivo. Los tiempos de adquisición fueron: (A) 0.052 s y (C) 0.084 s.

Para los experimentos básicos de la [figura 1.20](#) se empleó una muestra de estricnina 80 mM en CDCl_3 y un espectrómetro de 500 MHz. La secuencia UF básica empleada fue una secuencia de tiempo constante. Para el espectro de la izquierda (A) los parámetros de adquisición fueron: $\Delta\Omega_{\text{RF}} = 60$ kHz, $t_1^{\text{max}} = 10$ ms, $G_e = 8$ G/cm, $T_a = 210$ μs , $N_2 = 64$, $G_a = 26.7$ G/cm. Con estos parámetros las anchuras espectrales fueron $\text{SW}_2 = 4$ ppm y $\text{SW}_1 = 5.1$ ppm, con un tiempo de adquisición de 0.042 s. Para el experimento (B): $\Delta\Omega_{\text{RF}} = 60$ kHz, $t_1^{\text{max}} = 20$ ms, $G_e = 8$ G/cm, $T_a = 210$ μs , $N_2 = 64$, $G_a = 3.2$ G/cm. Con estos parámetros las anchuras espectrales fueron $\text{SW}_2 = 1$ ppm y $\text{SW}_1 = 1.2$ ppm. El tiempo de adquisición para este experimento fue 0.148 s. En ambos casos se aplicó un gradiente de purga de 200 μs y 13.4 G/cm. En ambos casos hubo que ajustar el *shearing* y se realizó un llenado con ceros en t_2 antes de la transformada de Fourier. Ambos espectros corresponden al espectro que se obtiene a partir de los datos adquiridos durante los gradientes positivos.

VI.3. Secuencias escalares homonucleares

VI.3.1 Codificación modulada en amplitud

El espectro UF-TOCSY de la [figura 2.2.A](#) se ha obtenido a 500 MHz con una muestra de estricnina 70 mM en CDCl_3 . Los parámetros del experimento fueron los siguientes: Tiempo de adquisición, $T_a = 210$ μs , con un tiempo de estabilización de los gradientes de 40 μs . La intensidad del gradiente durante la adquisición fue de 7.5 G/cm. La anchura de banda del pulso *chirp* fue 60 kHz, el tiempo de codificación total 20 ms y el gradiente durante dicha codificación 26.7 G/cm. Se han adquirido 128 pasos de la secuencia EPSI. Estos parámetros proporcionan una anchura espectral en F1, $\text{SW}_1 = 5.4$ ppm y en F2, $\text{SW}_2 = 4$ ppm. El experimento se ha obtenido en un único *scan*. Se ha usado una secuencia DIPSI que se aplicó durante 80 ms. Previo a la adquisición se aplicó un gradiente de purga de 16 G/cm durante 200 μs . El tiempo total de la adquisición fue de 0.164 s. Para la obtención del espectro se ha realizado un llenado con ceros en la dirección t_1 previo a la transformada de Fourier en la dirección t_2 y un filtro sinusoidal en la dirección t_2 . En la figura se muestra el espectro obtenido a partir de los datos adquiridos durante los gradientes negativos.

El experimento TOCSY tradicional de la [figura 2.2.B](#) se ha obtenido empleando la misma muestra anterior de estricnina. El programa de pulsos empleado fue *dipsi2etgpsi* del programa TOPSPIN 1.3. Se han adquirido 32 *scans* con 192 pasos en el eje t_1 con un tiempo de repetición de 1 s y empleado una secuencia DIPSI en la etapa de mezcla durante 80 ms. Las anchuras espectrales en ambas direcciones fueron: $\text{SW}_1 = 10$ ppm y $\text{SW}_2 = 10$ ppm, aunque en la figura 2.4 sólo se muestra la parte del espectro total que coincide con la ventana adquirida en el experimento UF. El tiempo total de adquisición

fue de 2 h 16 min. Para la obtención del espectro se ha realizado una multiplicación por una función seno cuadrado en ambas direcciones y una predicción lineal (se predicen 256 puntos con 32 coeficientes calculados) en la dirección t_1 previo a la transformada de Fourier. En esta dirección se realiza además un llenado con ceros hasta obtener 1024 puntos. Finalmente se ha realizado la corrección de fase en ambas direcciones.

En la [figura 2.3](#) se muestran los experimentos UF-TOCSY y TOCSY tradicional registrados a 700 MHz de una muestra de estricnina en CDCl_3 100 mM y 20 mM, respectivamente. Los parámetros para el experimento UF-TOCSY fueron los siguientes: Tiempo de adquisición $T_a = 178 \mu\text{s}$, teniendo en cuenta el tiempo de estabilización de los gradientes ($40 \mu\text{s}$). La intensidad del gradiente durante la adquisición fue de 7 G/cm. La anchura de banda del pulso *chirp* fue de 50 kHz, el tiempo total de codificación de 10 ms y el gradiente durante dicha codificación de 29.4 G/cm. Se han adquirido 64 pasos de la secuencia EPSI. Estos parámetros proporcionan una anchura espectral $\text{SW}_1 = 5.4 \text{ ppm}$ y $\text{SW}_2 = 4 \text{ ppm}$. El experimento se ha obtenido en un solo *scan*. Se aplicó una secuencia DIPSI durante 80 ms. El gradiente de purga anterior a la adquisición consistió en un gradiente sinusoidal de 16 G/cm aplicado durante 200 μs . Posterior a la adquisición y previo a la obtención del espectro se realizó un llenado con ceros en el dominio directo y una multiplicación por una función seno. El tiempo total del experimento fue de 0.123 s. El espectro que se muestra corresponde a la suma de los espectros obtenidos con los datos adquiridos durante los gradientes positivos y negativos.

Para el experimento TOCSY tradicional se han adquirido 16 *scans* con 192 incrementos en el eje t_1 . Se ha empleado asimismo una secuencia MLEV en la etapa de mezcla durante un tiempo de 90 ms. Las anchuras espectrales en ambas direcciones fueron: $\text{SW}_1 = 10 \text{ ppm}$ y $\text{SW}_2 = 10 \text{ ppm}$. El programa de pulsos empleado ha sido *mleveltgp* del programa TOPSPIN 2.1. Previo a la obtención del espectro se ha realizado la predicción lineal (se han calculado 256 puntos empleando 32 coeficientes) seguida de un llenado con ceros en la dirección t_1 , para obtener un total de 1024 puntos en esta dirección, y la multiplicación de los datos por una función seno cuadrado en ambas direcciones. Se ha realizado también una corrección de fase. El tiempo de adquisición del experimento fue de 1 h 6 min.

Para el estudio de las concentraciones mínimas a 500 y 700 MHz ([tabla 2.1](#)) se ha empleado una secuencia UF-TOCSY modulada en amplitud en un único *scan*. Los parámetros empleados en los experimentos registrados en el espectrómetro de 500 MHz son los mismos que los indicados para el espectro de la figura 2.2 A. Para los espectros adquiridos a 700 MHz se emplearon los mismos parámetros que los del espectro en 2.3 A.

Para la obtención de los espectros de la [figura 2.4](#) se ha empleado una muestra de estricnina en CDCl_3 : 100 mM, para el experimento UF (figura 2.4 A), y de 70 mM para el experimento tradicional (figura 2.4 B). Los parámetros del experimento UF-COSY modulado en amplitud fueron: $\text{NS}=1$; $T_a=250 \mu\text{s}$; $N_2=64$; $\Delta\Omega_{\text{RF}}=60 \text{ kHz}$; $G_e=8 \text{ G/cm}$; $t_1^{\text{max}}=20 \text{ ms}$; $G_a=25.7 \text{ G/cm}$. El tiempo para la secuencia de bloqueo de los espines fue de 20 ms. Se aplicó un gradiente sinusoidal de purga de 200 μs de duración y 16 G/cm. Para la obtención del espectro se realizaron los siguientes pasos: llenado con ceros en la dirección t_2 hasta triplicar el número de N_2 ; multiplicación por una función trapezoidal en la dirección t_2 ; corrección del desplazamiento entre los espectros de los gradientes positivos y negativos y suma de ambos espectros. Las anchuras espectrales obtenidas

fueron: $SW_1 = 4.8$ ppm y $SW_2 = 4$ ppm. El tiempo de adquisición fue de 0.0725 s. Los parámetros de adquisición del experimento COSY tradicional fueron: $N_1=192$; $NS=16$, $SW_1=10$ ppm; $SW_2=10$ ppm; tiempo de repetición = 1s; programa de pulsos = *cosygpgqf*. Para la obtención del espectro se realizó una multiplicación por una función seno t_1 y t_2 , una predicción lineal en la dirección t_1 (se calcularon 32 coeficientes con los que se obtuvieron 512 puntos) y un llenado con ceros en esta dirección hasta obtener 1024 puntos. El tiempo del experimento fue de 31 min 30 s.

En la [figura 2.5](#) se muestran los espectros UF-COSY modulado en amplitud (figura 2.5.A) y COSY tradicional (figura 2.5 B), adquiridos en un espectrómetro de 700 MHz equipado con una criosonda TCI, a partir de una muestra de estricnina en $CDCl_3$. La concentración de la muestra empleada en el experimento UF-COSY fue de 100 mM, mientras que para el experimento tradicional se utilizó una muestra 20 mM. Para el experimento ultrarrápido los parámetros de adquisición fueron: $NS=1$; $T_a=178$ μ s; $N_2=64$; $\Delta\Omega_{RF}=60$ kHz; $G_e=8$ G/cm; $t_1^{max}=10$ ms; $G_a=26.7$ G/cm. Se aplicó un gradiente sinusoidal de purga de 200 μ s de duración y 8 G/cm. El tiempo de la secuencia DIPSI fue de 20 ms. Las anchuras espectrales adquiridas fueron $SW_1 = 5.3$ ppm y $SW_2 = 4$ ppm. Para la obtención del espectro se ha realizado un ajuste de *shearing*, un llenado con ceros en la dimensión directa y una multiplicación por una función seno en esa misma dirección. Tras la corrección del desplazamiento se han sumado los espectros obtenidos mediante los datos adquiridos con los gradientes positivos y negativos. El tiempo de adquisición de este experimento fue de 0.053 s. El experimento tradicional se ha obtenido mediante la secuencia *cosygpgqf* del programa TOPSPIN en 15 min 15 s. Se adquirieron 4 scans para cada uno de los 192 incrementos en la dirección t_1 . El tiempo de repetición entre cada scan fue de 1 s. Las anchuras espectrales adquiridas en ambas dimensiones fueron de 10 ppm. Para la obtención del espectro se realizó una multiplicación por una función seno en ambas direcciones y una predicción lineal y un llenado con ceros en la dimensión indirecta hasta obtener un total de 1024 puntos.

VI.3.2. Codificación de tiempo constante

En la [figura 2.7](#) se muestran los espectros UF-TOCSY modulado de tiempo constante de una muestra 100 mM de estricnina en $CDCl_3$ (A) y TOCSY tradicional de una muestra 70 mM registrados a 500 MHz. El tiempo de adquisición del experimento UF-TOCSY fue de 0.168 s y del experimento tradicional 1 h 29 min. Los parámetros de los experimentos fueron: (A) $NS=1$; $T_a=250$ μ s; $N_2=96$; $\Delta\Omega_{RF}=60$ kHz; $G_e=7.5$ G/cm; $t_1^{max}=20$ ms; $G_a=42.8$ G/cm. Se aplicó un gradiente sinusoidal de purga de 200 μ s de duración y 13 G/cm. El tiempo de la secuencia DIPSI fue de 100 ms. Las anchuras espectrales adquiridas fueron $SW_1 = 4.3$ ppm y $SW_2 = 4$ ppm. Para la obtención del espectro se ha realizado un llenado con ceros en la dimensión directa y una multiplicación por una función seno en esa misma dirección. Tras la corrección del desplazamiento se han sumado los espectros obtenidos mediante los datos adquiridos con los gradientes positivos y negativos. (B) $N_1=192$; $NS=8$, $SW_1=10$ ppm; $SW_2=10$ ppm; tiempo de repetición = 1s; programa de pulsos = *dipsi2etgp* de TOPSPIN 1.3. Para la obtención del espectro se realizó una multiplicación por una función seno en t_1 y t_2 y un llenado con ceros en esta dirección hasta obtener 1024 puntos. El tiempo total del experimento fue de 31 min. Se ha realizado la corrección de fase en ambas direcciones.

En la [figura 2.9](#) se muestran tres experimentos COSY de una muestra de quinina 50 mM registrados a 500 MHz. (A) Espectro tradicional. Los parámetros de adquisición para este experimento fueron: $N_1=192$; $NS=8$, $SW_1=10$ ppm; $SW_2=10$ ppm; tiempo de repetición = 10 s; programa de pulsos = *cosygppf* de TOPSPIN 1.3. Para la obtención del espectro se realizó una multiplicación por una función seno en t_1 y t_2 y un llenado con ceros en esta dirección hasta obtener 1024 puntos. El tiempo de adquisición para este espectro fue de 31 min 30s. (B) Espectro UF-COSY de tiempo constante de la misma muestra. Los parámetros fueron: $NS=2$; $T_a=334$ μ s; $N_2=128$; $\Delta\Omega_{RF}=60$ kHz; $G_e=7.5$ G/cm; $t_1^{max}=20$ ms; $G_a=26.7$ G/cm; tiempo de repetición = 10 s. Se aplicó un gradiente sinusoidal de purga de 200 μ s de duración y 10.7 G/cm. Las anchuras espectrales adquiridas fueron $SW_1 = 3.5$ ppm y $SW_2 = 3$ ppm. Para la obtención del espectro se ha realizado un llenado con ceros en la dimensión directa y una multiplicación por una función trapezoidal en esa misma dirección. Tras la corrección del desplazamiento se han sumado los espectros obtenidos mediante los datos adquiridos con los gradientes positivos y negativos. El tiempo de adquisición del experimento fue 20.21 s (C) Espectro UF-COSY: igual al espectro en B, pero se ha aplicado una saturación de onda continua a 3.917 ppm durante 1s a una potencia de 0.2 mW. El tiempo de adquisición es el mismo que el anterior ya que, aunque la saturación se aplica durante 1s, el tiempo de repetición se ha reducido a 9 s.

En la [figura 2.10](#) se muestran en (A) una ampliación real, es decir, se muestra el mismo espectro que en 2.9 A ampliado y en (B) y (C) son nuevos espectros adquiridos con parámetros que permiten disminuir las anchuras espectrales a $SW_1 = 2.8$ ppm y $SW_2 = 2.5$ ppm. Para obtener estas ventanas los parámetros empleados han sido: $T_a=400$ μ s, ; $N_2=128$; $\Delta\Omega_{RF}=60$ kHz; $G_e=7.5$ G/cm; $t_1^{max}=20$ ms; $G_a=17.1$ G/cm. Los restantes parámetros de adquisición y procesamiento son los mismos que en el experimento 2.9 B. (C) Es el mismo experimento que en (B), en el que se aplica una saturación en la señal a 3.917 ppm. El tiempo de adquisición de los experimentos en B y C fue de 20.24 s.

VI.4. Secuencias escalares heteronucleares

VI.4.1. Experimentos 1H , ^{13}C

En la [figura 2.12](#) se muestran los espectros UF-HSQC (A) y HMQC tradicional (B) 1H , ^{13}C de la quinina registrados a 500 MHz. Para la adquisición del espectro UF se ha empleado una muestra 300 mM en $CDCl_3$. El tiempo total de codificación fue $t_1^{max}=5$ ms y la anchura de banda del pulso chirp $\Delta\Omega_{RF}=50$ kHz. El gradiente durante dicha codificación fue $G_e=24$ G/cm. La intensidad de los gradientes de adquisición fue $G_a=25.1$ G/cm, los cuales se aplicaron durante 222 μ s. En total se emplearon 64 gradientes bipolares en la adquisición. Se aplicó un gradiente de purga de 16 G/cm durante 200 μ s previo a la adquisición de los datos. El intervalo del bloque INEPT fue de 1.67 ms para permitir la detección de los acoplamientos a 150 Hz. Para el procesamiento de este espectro se ha realizado un llenado con ceros y una multiplicación por una función trapezoidal en la dirección t_2 . Tras la corrección del desplazamiento entre los espectros obtenidos con los datos adquiridos durante los gradientes positivos y negativos se han sumado ambos estos espectros. Se adquirieron en total 8 *scans*, lo que dio un tiempo total del experimento de 1 min 20 s. El espectro HMQC tradicional se ha obtenido de una muestra de quinina 50 mM en $CDCl_3$. Se ha empleado el programa de pulsos *hmqcgppf* del

programa TOPSPIN 1.3. Se adquirieron 4 scans y 256 pasos en la dirección t_1 con un tiempo de repetición de 1.5 s, lo que implica un tiempo de adquisición de 14 min 15 s. Se ha seleccionado una constante de acoplamiento de 155 Hz. Con anterioridad a la realización de la transformada de Fourier se ha efectuado un llenado con ceros en la dirección t_1 .

La [figura 2.13](#) presenta los espectros HSQC ^1H , ^{13}C ultrarrápido (A) y tradicional (B) de una muestra de estricnina en CDCl_3 registrados a 700 MHz. Para el espectro UF-HSQC se empleó una muestra 300 mM y los siguientes parámetros de adquisición: $\text{NS}=2$; $T_a=178\ \mu\text{s}$; $N_2=64$; $\Delta\Omega_{\text{RF}}=50\ \text{kHz}$; $G_e=26.75\ \text{G/cm}$; $t_1^{\text{max}}=3\ \text{ms}$; $G_a=34.8\ \text{G/cm}$. Se aplicó un gradiente sinusoidal de purga de $200\ \mu\text{s}$ de duración y $6.4\ \text{G/cm}$. Las anchuras espectrales adquiridas fueron $\text{SW}_1 = 87.8\ \text{ppm}$ y $\text{SW}_2 = 4\ \text{ppm}$. Se ha empleado un intervalo de $1.78\ \text{ms}$ para la obtención de las correlaciones de los acoplamientos a $140\ \text{Hz}$. Para la obtención del espectro se ha realizado un llenado con ceros en la dimensión directa y una multiplicación por una función trapezoidal en esa misma dirección. Tras la corrección del desplazamiento se han sumado los espectros obtenidos mediante los datos adquiridos con los gradientes positivos y negativos. El tiempo total del experimento fue de $20.07\ \text{s}$. Para el experimento tradicional se ha empleado la secuencia *hsqcetgp* de TOPSPIN 2.1. Se han adquirido 128 pasos en la dimensión t_1 . El número de *scans* fue 4 con un tiempo de repetición $1\ \text{s}$ y el tiempo de adquisición fue de $9\ \text{min}\ 34\ \text{s}$. Las anchuras espectrales fueron $\text{SW}_1 = 166\ \text{ppm}$ y $\text{SW}_2 = 13.3\ \text{ppm}$. Para la obtención del espectro se realizó un llenado con ceros en la dimensión indirecta y la corrección de fase en ambas direcciones.

En la [figura 2.14](#) se muestran los experimentos UF-HMBC (A) y HMBC tradicional (B) de una muestra de cloruro de butilo 300 mM en CDCl_3 adquiridos a 500 MHz. Los parámetros del experimento UF-HMBC son los siguientes: $\text{NS}=4$; $T_a=250\ \mu\text{s}$; $N_2=64$; $\Delta\Omega_{\text{RF}}=50\ \text{kHz}$; $G_e=26.75\ \text{G/cm}$; $t_1^{\text{max}}=5\ \text{ms}$; $G_a=24.1\ \text{G/cm}$. Se aplicó un gradiente sinusoidal de purga de $200\ \mu\text{s}$ de duración y $16.5\ \text{G/cm}$. Las anchuras espectrales adquiridas fueron $\text{SW}_1 = 50\ \text{ppm}$ para el ^{13}C y $\text{SW}_2 = 4\ \text{ppm}$ para el ^1H . Se ha empleado un intervalo de $27.8\ \text{ms}$ para la obtención de las correlaciones de los acoplamientos a $9\ \text{Hz}$. Para la obtención del espectro se ha realizado un llenado con ceros en la dimensión directa y una multiplicación por una función trapezoidal en esa misma dirección. Tras la corrección del desplazamiento se han sumado los espectros obtenidos mediante los datos adquiridos con los gradientes positivos y negativos. El tiempo total del experimento fue de $40.40\ \text{s}$. El experimento tradicional se ha adquirido empleando la secuencia *hmbcgplpndqf* de TOPSPIN 1.3. Los parámetros empleados fueron: $N_1=128$; $\text{NS}=2$; $\text{SW}_1=250\ \text{ppm}$ para el ^{13}C ; $\text{SW}_2=13\ \text{ppm}$ para el ^1H ; tiempo de repetición $\text{TR} = 1.5\ \text{s}$. Se han seleccionado una constante de acoplamiento de $10\ \text{Hz}$. El tiempo de adquisición fue de $8\ \text{min}\ 31\ \text{s}$. Para el procesamiento se ha realizado una predicción lineal en la dirección t_1 . Se han calculado 32 coeficientes y el número de puntos calculados 256. Posteriormente se ha realizado un llenado con ceros en esa dirección hasta obtener 1024 puntos.

VI.4.2. Experimentos ^1H , ^{15}N

En la [figura 2.16](#) se muestran los espectros UF-HSQC ^1H , ^{15}N y HSQC tradicional ^1H , ^{15}N de una muestra de de ubiquitina humana $1\ \text{mM}$ en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10), enriquecida en ^{15}N adquiridos a 700 MHz. Para el experimento UF-HSQC los parámetros de adquisición fueron: $\text{NS}=4$; $T_a=334\ \mu\text{s}$; $N_2=64$; $\Delta\Omega_{\text{RF}}=35\ \text{kHz}$; $G_e=42.8\ \text{G/cm}$; $t_1^{\text{max}}=20$

ms; $G_a=21.4$ G/cm. Se aplicó un gradiente sinusoidal de purga de 200 μ s de duración y 16 G/cm. Las anchuras espectrales adquiridas fueron $SW_1 = 14$ ppm para el ^{15}N y $SW_2 = 3$ ppm para el ^1H . Se ha empleado un intervalo de 2.8 ms para la obtención de las correlaciones de los acoplamientos a 90 Hz. El procesamiento de los datos adquiridos consistió en un llenado con ceros en ambas direcciones y la multiplicación por una función trapezoidal en la dimensión directa. El tiempo de adquisición del experimento fue de 1 min 20. El experimento tradicional se ha adquirido empleando la secuencia *hsqcetf3gpsi* de TOPSPIN 2.1. Los parámetros empleados fueron: $N_1=128$; $NS=4$; $SW_1=40$ ppm para el ^{15}N ; $SW_2=14$ ppm para el ^1H ; tiempo de repetición $TR = 1$ s. Se han seleccionado una constante de acoplamiento de 90 Hz. El tiempo de adquisición fue de 9 min 50 s. Para el procesamiento se ha realizado una apodización en ambas dimensiones empleando una función seno cuadrado y una predicción lineal en la dirección t_1 . Se han calculado 32 coeficientes y el número de puntos calculados 256. Posteriormente se ha realizado un llenado con ceros en esa dirección hasta obtener 2048 puntos. Finalmente se realizó el ajuste de la fase en ambas direcciones.

VI.4.3. Experimentos ^1H , ^{31}P

Los experimentos (A) UF-HMBC ^1H , ^{31}P y (B) HMBC ^1H , ^{31}P tradicional se muestran en la [figura 2.17](#). Estos espectros se han obtenido empleando una muestra de la mezcla de fosfonato de dietilbencilo 146.2 mM (**1**) y de clorofosfonato de dietilo 96.6 mM (**2**) en CDCl_3 en un espectrómetro de 500 MHz. El tiempo de adquisición del experimento ultrarrápido fue de 40.40 s. Los parámetros empleados fueron: $NS=4$; $T_a=222$ μ s; $N_2=64$; $\Delta\Omega_{\text{RF}}=50$ kHz; $G_e=15$ G/cm; $t_1^{\text{max}}=7$ ms; $G_a=32.3$ G/cm. Las anchuras espectrales adquiridas fueron $SW_1 = 40$ ppm para el ^{31}P y $SW_2 = 4.5$ ppm para el ^1H . Se aplicó un gradiente sinusoidal de purga de 200 μ s de duración y 16 G/cm. Se ha empleado un intervalo de 27.8 ms para la obtención de las correlaciones de los acoplamientos a 9 Hz. Se realizó una presaturación de onda continua durante 1 s, con una potencia de 0.2 mW sobre la señal a 3.13 ppm en ^1H . El procesamiento de los datos adquiridos consistió en una predicción lineal en la dirección t_2 y un llenado con ceros en dicha dimensión. Se ha realizado un filtrado mediante una función trapezio. Finalmente se ha corregido el desplazamiento entre los espectros obtenidos mediante los gradientes positivos y negativos y se han sumado ambos espectros. El tiempo de adquisición del experimento HMBC ^1H , ^{31}P tradicional fue de 14 min. Se han adquirido 128 pasos en la dimensión t_1 y 4 *scans* para cada uno de ellos. El tiempo de espera entre cada *scan* fue de 1.5 s. El programa de pulsos empleado fue *hmbcgpdpndqf* de TOPSPIN 1.3. Para el procesamiento se ha realizado una multiplicación por una función seno en ambas dimensiones, la predicción lineal en la dirección t_1 . Se han calculado 32 coeficientes y el número de puntos obtenidos fue de 256. Luego se ha realizado un llenado con ceros para obtener 1024 puntos en esa dirección. El espectro que se muestra es el espectro magnitud.

VI.5. Secuencias dinámicas de monitorización

Todos los experimentos de UF-NMR dinámicos ensayados para la monitorización en tiempo real de reacciones químicas, se realizaron en el tubo de resonancia de 5 mm en el interior de un imán, simultáneamente a la adquisición de los experimentos de RMN ultrarrápidos. Para este fin se diseñó el sistema de inyección que se muestra en la [figura](#)

[2.19](#). El dispositivo consta de un capilar de teflón de 0.5 mm, uno de cuyos extremos está conectado a una jeringuilla con un cierre Luer, que permitirá hacer la inyección de uno de los reactivos al tubo de resonancia donde se ha introducido el otro reactivo. El otro extremo del capilar de teflón se introduce en el tubo de resonancia y queda fijo mediante un orificio realizado en el tapón del tubo y una arandela de teflón introducida en él. En el tubo de resonancia se introduce uno de los reactivos en el disolvente deuterado elegido. Para que no haya mezcla de los reactivos anterior a la inyección, en el capilar de teflón se introducen en este orden: una burbuja de aire (aproximadamente de 10 μ L), la solución con el otro reactivo, otra burbuja de aire (entre 10 y 20 μ L) y finalmente el capilar se rellena con el disolvente. De esta forma, la presión se propaga de forma uniforme a lo largo del capilar cuando se realiza la inyección. En el tapón del tubo de resonancia se realizó otro orificio que permitirá que la presión no aumente cuando se introduzca el reactivo.

Una vez montado el sistema de inyección, se introduce el tubo de resonancia en el imán. La longitud del capilar de teflón debe ser lo suficientemente grande para permitir la inyección del reactivo mediante la jeringuilla de forma cómoda desde el exterior del imán.

Previo a la inyección se llevan a cabo los ajustes estándar: ajuste de los valores del *lock*, de la sintonía de la sonda y la homogeneidad del campo.

VI.5.1. Experimento UF-TOCSY dinámico

En este experimento se monitorizó la reacción de la 3-pentanona y el Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 . Para ello en el tubo de resonancia se introdujo una solución de Tf_2O (29.6 mg; 150 mM) en CD_3CN (0.5 ml). La inyección se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior.

En total se adquirieron 525 experimentos TOCSY cada 10 segundos (TR). Los parámetros de cada experimento fueron: ancho de banda del pulso chirp $\Delta\Omega_{\text{RF}}=60$ kHz; intensidad del gradiente de codificación $G_e=8$ G/cm; el tiempo total de codificación $t_1^{\text{max}}=20$ ms; intensidad del gradiente de adquisición $G_a=20$ G/cm; tiempo de adquisición $T_a=246$ μ s; número de pasos de la adquisición $N_2=64$; el tiempo de desconexión de los gradientes fue de 40 μ s. Con estos parámetros las anchuras espectrales en ambas dimensiones fueron $\text{SW}_1 = 3.63$ ppm y $\text{SW}_2 = 3.5$ ppm. El gradiente de purga antes de la adquisición consistió en un gradiente con forma sinusoidal con una intensidad de 16 G/cm aplicado durante 200 μ s. La secuencia de *spin-lock* se aplicó durante 20 ms.

VI.5.2. Experimento UF-HMBC dinámico

Para la monitorización mediante experimentos UF-HMBC se seleccionó la reacción de la acetofenona con el Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 . Los reactivos se dispusieron en el tubo de resonancia y en el capilar de teflón como se ha indicado en el apartado VI.5.

Los parámetros de cada experimento UF-HMBC fueron: Tiempo total de codificación, $t_1^{\text{max}}=5$ ms; Intensidad del gradiente de codificación, $G_e=27$ G/cm; tiempo de adquisición, $T_a=142$ μ s; Intensidad del gradiente de adquisición, $G_a=40$ G/cm; Ancho de banda del pulso chirp, $\Delta\Omega_{\text{RF}}=50$ kHz; Número de pasos de la adquisición, $N_2=64$;

Número de *scans* de cada experimento, NS=2. Estos parámetros dan lugar a anchuras espectrales aproximadas de $SW_2 = 7$ ppm para el ^1H y $SW_1 = 50$ ppm para el ^{13}C .

VI.5.3. Experimento UF-TOCSY/HMBC dinámicos

Siguiendo el mismo procedimiento descrito en los apartados anteriores se realizó la reacción de la ciclohexanona con el Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 para realizar su seguimiento mediante una doble secuencia UF-TOCSY/HMBC. La reacción se llevó a cabo a 5°C y se adquirieron en total 250 experimentos UF-TOCSY y 250 UF-HMBC. El tiempo del experimento completo fue de 1h 46 min. Los parámetros de adquisición para la secuencia UF-TOCSY fueron: $\Delta\Omega_{\text{RF}}=60$ kHz, $G_e=8$ G/cm; $t_1^{\text{max}}=20$ ms; $G_a=14.5$ G/cm; $T_a=334$ μs ; el tiempo de mezcla fue de 90 ms; las anchuras espectrales fueron $SW_1 = 3.2$ ppm y $SW_2 = 3$ ppm. Los parámetros de adquisición para la secuencia UF-HMBC fueron: $\Delta\Omega_{\text{RF}}=50$ kHz, $G_e=26.75$ G/cm; $t_1^{\text{max}}=5$ ms; $G_a=19.26$ G/cm; $T_a=334$ μs ; El tiempo de la secuencia INEPT fue de 25 ms para obtener los acoplamientos de 10 Hz; las anchuras espectrales fueron $SW_1 = 68$ ppm para el ^{13}C y $SW_2 = 3$ ppm para el ^1H . En ambos casos se aplicó un gradiente de purga de 16 G/cm durante 200 μs .

VI.6. Secuencias dipolares homonucleares

En la [figura 3.2](#) se muestran superpuestos los espectros NOESY y TOCSY tradicionales de una muestra 10 mM de estricnina en CDCl_3 adquiridos en un espectrómetro de 700 MHz. Los parámetros del experimento NOESY fueron: NS = 16; $N_1 = 128$; TR = 2 s; $SW_1 = SW_2 = 10$ ppm; tiempo de mezcla = 300 ms. El programa de pulso empleado fue *noesygpph* de TOPSPIN 2.1. Para el procesamiento se realizó una multiplicación por una función seno cuadrado en ambas dimensiones. En la dimensión t_1 se realizó una predicción lineal. Se calcularon 32 coeficientes y el número de puntos obtenidos fue 256. En esta dirección se aplicó un llenado con ceros para obtener 1024 puntos. Finalmente se realizó una corrección de la fase. Para el experimento TOCSY los parámetros fueron: NS = 16; $N_1 = 256$; TR = 1 s; $SW_1 = SW_2 = 10$ ppm; tiempo de mezcla = 90 ms. El programa de pulso empleado fue *mleveltgp* de TOPSPIN 2.1. Para el procesamiento se realizaron los mismos pasos que para el experimento NOESY.

VI.6.1. NOESY

En la [figura 3.4](#) se muestran los experimentos UF-NOESY (A) modulado en amplitud y (B) de tiempo constante de una muestra de estricnina 250 mM en CDCl_3 en un equipo de 500 MHz. Para el experimento UF-NOESY en (A) se ha empleado los siguientes parámetros: NS=8; TR = 10 s; $T_a=250$ μs ; $N_2=64$; $\Delta\Omega_{\text{RF}}=60$ kHz; $G_e=8$ G/cm; $t_1^{\text{max}}=20$ ms; $G_a=25.7$ G/cm. Las anchuras espectrales adquiridas fueron $SW_1 = 4.8$ y $SW_2 = 4$ ppm. Se aplicó un gradiente sinusoidal de purga de 200 μs de duración y 16 G/cm. El tiempo de mezcla fue de 1.1 s. El procesamiento de los datos adquiridos consistió en un llenado con ceros la dimensión directa. Se ha realizado un filtrado mediante una función seno. Finalmente se ha corregido el desplazamiento entre los espectros obtenido mediante los gradientes positivos y negativos y se han sumado ambos espectros. El tiempo de adquisición fue de 1 min 29 s. Para el experimento UF-NOESY en (B) se ha empleado los siguientes parámetros: NS=8; TR = 10 s; $T_a=250$ μs ; $N_2=64$; $\Delta\Omega_{\text{RF}}=60$

kHz; $G_e=8$ G/cm; $t_1^{\max}=10$ ms; $G_a=25.7$ G/cm. Las anchuras espectrales adquiridas fueron $SW_1 = 4.9$ y $SW_2 = 4$ ppm. Se aplicó un gradiente sinusoidal de purga de 200 μ s de duración y 16 G/cm. El tiempo de mezcla fue de 1.1 s. El procesamiento de los datos adquiridos consistió en un llenado con ceros la dimensión directa. Se ha realizado un filtrado mediante una función seno. Finalmente se ha corregido el desplazamiento entre los espectros obtenido mediante los gradientes positivos y negativos y se han sumado ambos espectros. El tiempo de adquisición fue de 1 min 29 s.

En la [figura 3.6](#) se muestran los experimentos UF-NOESY diferencia de una muestra de esticnina 250 mM en $CDCl_3$ adquiridos a 500 MHz. En (A) se ha incluido la diferencia del experimento UF-NOESY y el experimento UF-diagonal. En este caso se han empleados las secuencias de tiempo constante. Los parámetros comunes a ambos experimentos son: $TR = 10$ s; $T_a=250$ μ s; $N_2=64$; $\Delta\Omega_{RF}=60$ kHz; $G_e=8$ G/cm; $t_1^{\max}=10$ ms; $G_a=25.7$ G/cm. Las anchuras espectrales adquiridas fueron $SW_1 = 4.9$ y $SW_2 = 4$ ppm. En ambos casos se aplica un gradiente de purga de 16 G/cm durante 200 μ s. El número de repeticiones del experimento UF-NOESY fue 8 y del experimento UF-diagonal 1. El tiempo de mezcla de la secuencia UF-NOESY fue de 1s. Para la obtención del espectro diferencia se realizó una predicción lineal en t_2 . El número de puntos predichos fue de 256. Se ha aplicado un filtro seno en esa misma dirección. Tras la corrección del desplazamiento, se han sumado los espectros obtenidos con los datos adquiridos durante los gradientes positivos y negativos. En (B) se muestra la diferencia del experimento UF-NOESY y el experimento UF-TOCSY. La secuencia empleada en este caso es una secuencia modulada en amplitud. Los parámetros compartidos por ambos experimentos son: $TR = 10$ s; $T_a=250$ μ s; $N_2=64$; $\Delta\Omega_{RF}=60$ kHz; $G_e=8$ G/cm; $t_1^{\max}=20$ ms; $G_a=25.7$ G/cm. Las anchuras espectrales adquiridas fueron $SW_1 = 4.8$ y $SW_2 = 4$ ppm. En ambos casos se aplica un gradiente de purga antes de la adquisición durante 200 μ s de intensidad 16 G/cm. El número de repeticiones del experimento UF-NOESY fue 8 y del experimento UF-TOCSY 1. El tiempo de mezcla de la secuencia UF-NOESY fue de 1s. Para la obtención del espectro diferencia se realizó un llenado con ceros en t_2 para dar un número de puntos total de 256. Se ha aplicado un filtro seno en esa misma dirección. Tras la corrección del desplazamiento, se han sumado los espectros obtenidos con los datos adquiridos durante los gradientes positivos y negativos.

VI.6.2. **Exo-NOESY**

En la [figura 3.9](#) podemos observar los espectros NOESY tradicional (A) y su ampliación (C) y ExoNOESY tradicional (B) y su ampliación (D) de una muestra de esticnina 100 mM en $CDCl_3$ adquiridos en un equipo de 500 MHz. Los parámetros de adquisición del experimento en (A) fueron: $TR = 1$ s; $N_1 = 192$; $NS = 32$; $SW_1 = SW_2 = 10$ ppm; Tiempo de mezcla = 400 ms. El tiempo total de adquisición fue de 2 h 49 min. Para la obtención del espectro se realizó una predicción lineal y un llenado con ceros en la dirección t_1 . En ambas direcciones se realizó una apodización por una función seno cuadrado y una corrección de la fase. El programa de pulsos empleado fue *noesyetgp* de TOPSPIN 1.3. Para el espectro en (B) $TR = 1$ s; $N_1 = 128$; $NS = 16$; $SW_1 = SW_2 = 10$ ppm; Tiempo de mezcla = 400 ms. El tiempo total del experimento fue de 55 min 35 s. Para la selección del área del espectro se emplearon 3 pulsos Sneeze de 10 ms. Para un pulso de esa duración la banda de excitación teórica es de 1 ppm aproximadamente. – estos pulsos están centrados a 2.5 ppm por debajo del centro de la ventana espectral en

ambas dimensiones. Para la obtención del espectro se realizó una predicción lineal y una llenado con ceros igual que el anterior. Se aplicó una función seno en ambas direcciones. El espectro se ha presentado en modo magnitud, debido a que es muy difícil poner en fase las señales que provienen de experimentos que emplean pulsos selectivos para la excitación.

En la [figura 3.11](#) se muestra el experimento UF-ExoNOESY de una muestra de estricnina 300 mM en CDCl_3 registrado a 500 MHz. Los parámetros de adquisición para este experimento fueron: $\text{NS}=2$; $\text{TR} = 10 \text{ s}$; $T_a=250 \text{ } \mu\text{s}$; $N_2=64$; $\Delta\Omega_{\text{RF}}=60 \text{ kHz}$; $G_e=8 \text{ G/cm}$; $t_1^{\text{max}}=10 \text{ ms}$; $G_a=26.75 \text{ G/cm}$. Las anchuras espectrales adquiridas fueron $\text{SW}_1 = 5.1$ y $\text{SW}_2 = 4 \text{ ppm}$. Se aplicó un gradiente sinusoidal de purga de $200 \text{ } \mu\text{s}$ de duración y 13.4 G/cm . El tiempo de mezcla fue de 0.8 s . Para la selección del área del espectro adquirida se han empleado 3 pulsos Sneeze de 5 ms de duración, lo que proporciona una banda teórica de 2.3 ppm . Los pulsos se centraron a 1 ppm por encima del centro de la ventana espectral en la dirección F2 y a 1 ppm por debajo del centro espectral de la ventana en la dimensión F1. El procesado de los datos adquiridos consistió en la predicción lineal en ambas dimensiones. Se ha obtenido una matriz de 256×256 puntos. Se ha corregido el desplazamiento entre los espectros obtenido mediante los gradientes positivos y negativos y se han sumado ambos espectros. El tiempo total de adquisición de los espectros fue de 21.71 s .

En la [figura 3.12](#) se muestra el experimento UF-ExoNOESY de una muestra de estricnina 300 mM en CDCl_3 adquirido en un espectrómetro de 700 MHz. Los parámetros de adquisición de espectro fueron: $\text{NS}=8$; $\text{TR} = 10 \text{ s}$; $T_a=178 \text{ } \mu\text{s}$; $N_2=64$; $\Delta\Omega_{\text{RF}}=50 \text{ kHz}$; $G_e=6.4 \text{ G/cm}$; $t_1^{\text{max}}=5 \text{ ms}$; $G_a=26.75 \text{ G/cm}$. Las anchuras espectrales adquiridas fueron $\text{SW}_1 = 5.6$ y $\text{SW}_2 = 4 \text{ ppm}$. El tiempo de mezcla fue de 800 ms . Para la selección del área del espectro se emplearon 3 pulsos Sneeze de 5 ms . El ancho de banda teórica de excitación de estos pulsos es de 1.6 ppm . Estos pulsos se centraron a 1.5 ppm por encima del centro de la ventana de F2 y 1.5 ppm por debajo del centro de la ventana de F1. El tiempo de adquisición fue de $1 \text{ min } 27 \text{ s}$. Para la obtención del espectro se realizó un llenado con ceros en la dirección t_2 , para dar 256 puntos en esa dimensión, y se aplicó un filtro trapezoidal. Una vez corregido el desplazamiento se sumaron los espectros adquiridos durante los gradientes positivos y negativos.

VII. ANEXOS

APÉNDICE A

En este Apéndice se incluyen los listados de los **programas de pulsos** desarrollados a lo largo de desarrollo de este trabajo. Se han incluido los programas escritos para TOPSPIN 1.3 y que funcionan en el espectrómetro AV500 del CAI de RMN y RSE de la UCM. Para otras versiones de TOPSPIN y otros espectrómetros los cambios necesarios serían mínimos.

Programa de pulsos del experimento UF-diagonal modulado en amplitud (ufdiag.ucm)

```
;ufdiag.ucm
;avance-version (05/10/24)
;single scan basic experiment
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
1      ze
2      d11
      d1 BLKGRAD
      UNBLKGRAD
      pl1:f1
      gron1
      p11:sp1 ph1
      5u groff
      d16
      5u gron2
      p11:sp1 ph4
      5u groff
      d16
      p1:f1 ph3
      p16:gp6
      d16
      (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc
rdeadc RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
      4u DWELL_GEN:f1
5      p13:gp3
      d16
      p13:gp4
      d16
lo to 5 times l4
rcyc=2
30m mc #0 to 2 F0(zd)
d11 BLKGRAD
exit
ph29=0
ph1=0 2
ph4=0 0
ph3=0
ph30=0
ph31=0 2
```

Programa de pulsos del experimento UF-TOCSY modulado en amplitud (uftocsy.ucm)

```
;uftocsy.ucm
;avance-version (06/04/05)
;single scan H-H correlation, Hartman-Hahn transfer using DIPSY sequence for mixing
;using two power levels for excitation and spinlock
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2+0.5"
"l1=FACTOR1*2"
1      ze
2      d11
d1 BLKGRAD
50u UNBLKGRAD
d12 pl1:f1
5u gron1
p11:sp1 ph1
5u groff
d16
5u gron2
p11:sp1 ph4
5u groff
d16
d12 pl10:f1
;begin DIPSI2
4      p6*3.556 ph23
p6*4.556 ph25
p6*3.222 ph23
p6*3.167 ph25
p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
p6*3.556 ph25
p6*4.556 ph23
p6*3.222 ph25
p6*3.167 ph23
p6*0.333 ph25
p6*2.722 ph23
p6*4.167 ph25
p6*2.944 ph23
p6*4.111 ph25
p6*3.556 ph25
p6*4.556 ph23
p6*3.222 ph25
p6*3.167 ph23
p6*0.333 ph25
p6*2.722 ph23
p6*4.167 ph25
p6*2.944 ph23
p6*4.111 ph25
p6*3.556 ph23
p6*4.556 ph25
p6*3.222 ph23
p6*3.167 ph25
```

```

        p6*0.333 ph23
        p6*2.722 ph25
        p6*4.167 ph23
        p6*2.944 ph25
        p6*4.111 ph23
lo to 4 times l1
;end DIPSI2
    d12 pl1:f1
    p1:f1 ph3
    p16:gp6
    d16
    (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc
rdeadc RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
    4u DWELL_GEN:f1
5    p13:gp3
    d16
    p13:gp4
    d16
lo to 5 times l4
rcyc=2
30m mc #0 to 2 F0(zd)
4u BLKGRAD
exit
ph23=3
ph25=1
ph3=0
ph1 = 0 2
ph4 = 2 2
ph30 = 0
ph31 = 0 2

```

Programa de pulsos del experimento UF-TOCSY de tiempo constante (uftocsyCT.ucm)

```

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2+0.5"
"I1=FACTOR1*2"
1    ze
2    d11
    d1 BLKGRAD
    50u UNBLKGRAD

    d12 pl1:f1
    p1 ph1
    5u gron1
    p11:sp1 ph4 ;180
    5u groff
    d16
    5u gron2
    p11:sp1 ph5 ;180
    5u groff
    d16
;begin DIPSI2
4    p6*3.556 ph23
    p6*4.556 ph25
    p6*3.222 ph23

```

```

p6*3.167 ph25
p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
p6*3.556 ph25
p6*4.556 ph23
p6*3.222 ph25
p6*3.167 ph23
p6*0.333 ph25
p6*2.722 ph23
p6*4.167 ph25
p6*2.944 ph23
p6*4.111 ph25
p6*3.556 ph25
p6*4.556 ph23
p6*3.222 ph25
p6*3.167 ph23
p6*0.333 ph25
p6*2.722 ph23
p6*4.167 ph25
p6*2.944 ph23
p6*4.111 ph25
p6*3.556 ph23
p6*4.556 ph25
p6*3.222 ph23
p6*3.167 ph25
p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
lo to 4 times l1
;end DIPSI2
p16:gp6
d16
(de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc
rdeadc RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
4u DWELL_GEN:f1
5 p13:gp3
d16
p13:gp4
d16
lo to 5 times l4
rcyc=2
30m mc #0 to 2 F0(zd)
d11 BLKGRAD
exit
ph1=0 2
ph2=0 0
ph4=0
ph5=0
ph6=0 2
ph30=0
ph31=0 2
ph21=0
ph23=3
ph25=1

```

Programa de pulsos del experimento UF-COSY de tiempo constante (ufcosyCT.ucm)

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
1    ze
2    d11
    d1 BLKGRAD
    50u UNBLKGRAD
    d12 pl1:f1
    p1 ph1
    5u gron1
    p11:sp1 ph4 ;180
    5u groff
    d16
    5u gron2
    p11:sp1 ph5 ;180
    5u groff
    d16
    d9
    p2 ph2
    p16:gp6
    d16
    (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc
rdeadc RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
    4u DWELL_GEN:f1
5    p13:gp3
    d16
    p13:gp4
    d16
lo to 5 times l4
rcyc=2
30m mc #0 to 2 F0(zd)
d11 BLKGRAD
exit
ph1=0 2
ph2=0 0
ph4=0
ph5=0 ;2 2
ph6=0 2
ph30=0
ph31=0 2
ph21=0
ph29=0
```

Programa de pulsos del experimento UF-HSQC modulado en amplitud (ufhsqc.ucm)

```
;sshsqc.ucm
;avance-version (05/10/24)
;single scan H-C shift correlation
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
"d7=0.5*(d16-p2*2)"
"d17=d4-p16-d16"
```

```

1      ze
2      d1
      d11 BLKGRAD
      d11 UNBLKGRAD
      12 pl1:f1 pl2:f2
      (p1 ph1):f1
      d4
      (center (p2*2 ph7):f2 (p1*2 ph2):f1)
      d4
      (p1 ph3):f1
      5u gron1
      (p12:sp2 ph8):f2
      5u groff
      d16
      (p1*2 ph4):f1
      d16
      5u gron2
      (p12:sp2 ph9):f2
      5u groff
      d16
      d12 pl1:f1 pl2:f2
      (p1 ph5):f1
      d4
      (center (p1*2 ph6):f1 (p2*2 ph10):f2)
      d17          ;=d4-p16-d16
      p16:gp6
      d16
      (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc
rdeadc RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
      4u DWELL_GEN:f1
      10u pl12:f2
      5u cpd2:f2
7      p13:gp3
      ;d7
      ;(p2*2 ph0):f2
      d16
      p13:gp4
      ;d7
      ;(p2*2 ph0):f2
      d16
lo to 7 times l4
5u do:f2
rcyc=2
30m mc #0 to 2 F0(zd)
d11 BLKGRAD
exit
ph1=0
ph2=0
ph3=1
ph4=0
ph5=0
ph6=0
ph0=0
ph7=0
ph10=0
ph30=0
ph8=0 2
ph9=2 2
ph31=0 2

```

Programa de pulsos del experimento UF-HSQC de tiempo constante con watergate 3-9-19 y núcleo X en el canal 3(ufhsqcCTf3w9.ucm)

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
define delay DELTA
define delay DELTA1
define delay DELTA2
define delay DELTA3
"d7=0.5*(d16-p3*2)"
"d17=d4-p16-d16"
"DELTA=d19-((p3*2)/2)"
"DELTA1=d4-p15-d16-p27*2.385-d19*5"
"DELTA2=d4-p15-d16-p27*2.154-p0*0.231-d19*5-8u"
"DELTA3=d4-p15-d16-p27*2.154-p0*0.231-d19*5-8u-p16-d16"
1    ze
2    d1
    5u BLKGRAD
    d11 UNBLKGRAD
    d12 pl1:f1 pl3:f3
    (p1 ph1):f1
    d4
    (center(p3*2 ph7):f3 (p1*2 ph2):f1)
    d4
    (center(p1 ph3):f1 (p3 ph8):f3)
    5u gron1
    (p23:sp3 ph18):f3
    5u groff
    d16
    (p1*2 ph4):f1
    d16
    5u gron2
    (p23:sp3 ph19):f3
    5u groff
    d16 pl1:f1 pl3:f3
    (center(p1 ph5):f1 (p3 ph9):f3)
    d4
    (center(p1*2 ph6):f1 (p3*2 ph10):f3)
    d4 pl1:f1 pl3:f3 fq1:f1
    DELTA1
    p15:gp15
    d16 pl18:f1
    p27*0.231 ph11
    d19*2
    p27*0.692 ph11
    d19*2
    p27*1.462 ph11
    d19*2
    p27*1.462 ph12
    d19*2
    p27*0.692 ph12
    d19*2
    p0*0.231 ph12
    4u
    p15:gp15
    d16
    DELTA3 fq=0:f1 pl1:f1
```



```

p16:gp6
d16
(rde1 sync de1 adc ph31 syrec) (1u 1u ph30:r):f1 (de)
4u cpdngs17:f1
10u pl13:f3
5u cpd3:f3 ;desacoplador
7 p13:gp3
;d7
;(p3*2 ph0):f3
;d7
d16 ;desacoplador
p13:gp4
;d7
;(p3*3 ph0):f3
;d7
d16 ;desacoplador
lo to 7 times l4
5u do:f3 ;desacoplador
d11 BLKGRAD
rcyc=2
30m mc #0 to 2 F0(zd)
exit
ph0=0
ph1=0
ph2=0
ph3=1
ph4=0
ph5=1
ph6=0
ph7=0 0 0 0 2 2 2 2
ph8=0 2
ph9=0 0 2 2
ph10=0 0 0 0 2 2 2 2
ph11=0
ph12=2
ph18=0
ph19=2
ph29=0
ph30=0
ph31=0 2 2 0

```

Programa de pulsos del experimento UF-TOCSY modulado en amplitud dinámico (uftocsyDYN.ucm)

```

; uftocsyDYN.ucm
;avance-version (06/04/05)
;single scan H-H correlation, Hartman-Hahn transfer using DIPSY sequence for mixing
;using two power levels for excitation and spinlock
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2+0.5"
"l1=FACTOR1*2"
1 ze
6 d0
2 d11
50u BLKGRAD
50u UNBLKGRAD

```

```

d1
d12 pl1:f1
5u gron1
p11:sp1 ph1
5u groff
d16
5u gron2
p11:sp1 ph4
5u groff
d16
d12 pl10:f1
;begin DIPSI2
4    p6*3.556 ph23
      p6*4.556 ph25
      p6*3.222 ph23
      p6*3.167 ph25
      p6*0.333 ph23
      p6*2.722 ph25
      p6*4.167 ph23
      p6*2.944 ph25
      p6*4.111 ph23
      p6*3.556 ph25
      p6*4.556 ph23
      p6*3.222 ph25
      p6*3.167 ph23
      p6*0.333 ph25
      p6*2.722 ph23
      p6*4.167 ph25
      p6*2.944 ph23
      p6*4.111 ph25
      p6*3.556 ph25
      p6*4.556 ph23
      p6*3.222 ph25
      p6*3.167 ph23
      p6*0.333 ph25
      p6*2.722 ph23
      p6*4.167 ph25
      p6*2.944 ph23
      p6*4.111 ph25
      p6*3.556 ph23
      p6*4.556 ph25
      p6*3.222 ph23
      p6*3.167 ph25
      p6*0.333 ph23
      p6*2.722 ph25
      p6*4.167 ph23
      p6*2.944 ph25
      p6*4.111 ph23
;end DIPSI2
      d12 pl1:f1
      p1:f1 ph3
      p16:gp6
      d16
      (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc
rdeadc RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
      4u DWELL_GEN:f1
5    p13:gp3
      d16
      p13:gp4

```

```

        d16
lo to 5 times l4
rcyc=2
30m mc #0 to 6 F1QF(zd)
4u BLKGRAD
exit
ph23=3
ph25=1
ph29=0
ph3=0
ph1 = 0 2
ph4 = 2 2
ph30 = 0
ph31 = 0 2

```

Programa de pulsos del experimento UFHSQC modulado en amplitud dinámico (ufhsqcDYN.ucm)

```

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
"d7=(d16-p2*2)"
"d17=d4-p16"
1      ze
6      d0
2      d11
      50u BLKGRAD
      50u UNBLKGRAD 3 d1
      d12 pl1:f1 pl2:f2
      (p1 ph1)
      d4
      (center(p2*2 ph7):f2 (p1*2 ph2):f1)
      d4
      (p1 ph3)
      5u gron1
      (p12:sp2 ph8):f2
      5u groff
      d16
      (p1*2 ph4):f1
      d16
      5u gron2
      (p12:sp2 ph9):f2
      5u groff
      d16
      d12 pl1:f1 pl2:f2
      (p1 ph5):f1
      d4
      (center (p1*2 ph6):f1 (p2*2 ph10):f2)
      d17      ;=d4-p16-d16
      p16:gp6
      d16
      (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc
rdeadc RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
      4u DWELL_GEN:f1
      10u pl12:f2 cpd2:f2
7      p13:gp3
      ;d7
      ;(p2*2 ph0):f2

```

```

d16
p13:gp4
;d7
;(p2*2 ph0):f2
d16
lo to 7 times l4
5u do:f2
rcyc=2
30m mc #0 to 6 F1QF(zd)
d11 BLKGRAD
exit
ph1=0
ph2=0
ph3=1
ph4=0
ph5=1
ph6=0
ph0=0
ph7=0 0 0 0 2 2 2 2
ph10=0 0 0 0 2 2 2 2
ph30=0 ph8=2 0
ph9=2 2
ph31=2 0

```

Programa de pulsos del experimento UF-TOCSY-HSQC modulado en amplitud dinámico (uftocsyhsqcDYN.ucm)

```

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
"d7=(d16-p2*2)"
"d17=d4-p20"
"d36=p2-p1"
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2+0.5"
"l1=FACTOR1*2"
define loopcounter td1medio
"td1medio = td1 * 0.5"
;TOCSY
1      ze
      d2
2      d1 BLKGRAD
      50u UNBLKGRAD
      d12 pl1:f1
      5u gron1
      p11:sp1 ph1
      5u groff
      d16
      5u gron2
      p11:sp1 ph2
      5u groff
      d16
;begin DIPSI2
      d12 pl11:f1
3      p6*3.556 ph23
      p6*4.556 ph25
      p6*3.222 ph23
      p6*3.167 ph25
      p6*0.333 ph23

```

```

p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
p6*3.556 ph25
p6*4.556 ph23
p6*3.222 ph25
p6*3.167 ph23
p6*0.333 ph25
p6*2.722 ph23
p6*4.167 ph25
p6*2.944 ph23
p6*4.111 ph25
p6*3.556 ph25
p6*4.556 ph23
p6*3.222 ph25
p6*3.167 ph23
p6*0.333 ph25
p6*2.722 ph23
p6*4.167 ph25
p6*2.944 ph23
p6*4.111 ph25
p6*3.556 ph23
p6*4.556 ph25
p6*3.222 ph23
p6*3.167 ph25
p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
lo to 3 times l1
;end DIPSI2
d12 pl1:f1
p1:f1 ph3
p15:gp5
d16
(de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc
rdeadc RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
4u DWELL_GEN:f1
4 p13:gp3
d16
p13:gp4
d16
lo to 4 times l4
100u eoscp
5u ipp1 ipp2 ipp3 ipp23 ipp25 ipp29 ipp31
lo to 2 times l2
d11 wr #0 if #0 zd
;HSQC
5 ze
d2
6 d1 BLKGRAD
50u UNBLKGRAD
d12 pl1:f1 pl2:f2
(p1 ph11):f1
d4
(d36 p1*2 ph12) (p2*2 ph17):f2
d4

```

```

    (p1 ph13):f1
    5u gron6
    (p12:sp2 ph18):f2
    5u groff
    d16
    (p1*2 ph14):f1
    d16
    5u gron7
    (p12:sp2 ph19):f2
    5u groff
    d16
    (p1 ph15):f1
    d4
    (d36 p1*2 ph16) (p2*2 ph20):f2
    d17
    p20:gp10
    d16
    (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc
rdeadc RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
    4u DWELL_GEN:f1
    10u pl12:f2 cpd2:f2
7    p18:gp8
    ;d7
    ;(p2*2 ph0):f2
    d16
    p18:gp9
    ;d7
    ;(p2*2 ph0):f2
    d16
lo to 7 times l4
5u do:f2
100u eoscpn
5u ipp0 ipp11 ipp12 ipp13 ipp14 ipp15 ipp16 ipp17 ipp18 ipp19 ipp20 ipp29 ipp31
lo to 6 times ns
d11 wr #0 if #0 zd
lo to 1 times td1medio
d11 BLKGRAD
exit
ph1=0 2
ph2=2 2
ph3=0
ph11=0
ph12=0
ph13=1
ph14=0
ph15=1
ph16=0
ph0=0
ph17=0 0 0 0 2 2 2 2
ph20=0 0 0 0 2 2 2 2
ph18=0 2
ph19=2 2
ph23=3
ph25=1
ph29=0
ph30=0
ph31=0 2

```

Programa de pulsos del experimento UF-NOESY modulado en amplitud (ufnoesy.ucm)

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
1      ze
2      d11
      d1 BLKGRAD
      50u UNBLKGRAD
      d12 pl1:f1
      d16 gron1
      p11:sp1 ph1
      d16 groff
      d16 gron2
      p11:sp1 ph2
      d16 groff
      d8
      d12 pl1:f1
      p1:f1 ph3
      p16:gp6
      d16
      (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc
rdeadc RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
      4u DWELL_GEN:f1
5      p13:gp3
      d16
      p13:gp4
      d16
lo to 5 times l4          ;td=aq/dw, aq=6+(l4(2*(p16+40u)))/dw
rcyc=2
30m mc #0 to 2 F0(zd & ip1 & ip2 & ip3 & ip31)
d11 BLKGRAD
exit
ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
ph3=0 0 2 2 1 1 3 3
ph30=0
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3
```

Programa de pulsos del experimento UF-NOESY de tiempo constante (ufnoesyCT.ucm)

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
1      ze
2      d11
      d1 BLKGRAD
      50u UNBLKGRAD
      d12 pl1:f1
      p1 ph1
      d12 pl1:f1
      5u gron1
      p11:sp1 ph4 ;180
      5u groff
      d16
```

```

5u gron2
5u p11:sp1 ph5 ;180
5u groff d16
d12 pl1:f1
p1 ph2
d8
p1 ph3
p16:gp6
d16
(de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc
rdeadc RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
4u DWELL_GEN:f1
5 p13:gp3
d16
p13:gp4
d16
lo to 5 times l4
rcyc=2
30m mc #0 to 2 F0(zd)
d11 BLKGRAD
exit
ph1=0
ph2=0
ph3=0
ph4=0
ph5=0
ph30=0
ph31=0

```

Programa de pulsos del experimento UF-NOESY-UF-diagonal de tiempo constante (ufnoesynodiagCT.ucm)

```

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
1 ze
;NOESY
2 d11
d1 BLKGRAD
50u UNBLKGRAD
d12 pl1:f1
p1 ph1
5u gron1
p11:sp1 ph4 ;180
5u groff
d16
5u gron2
p11:sp1 ph5 ;180
5u groff
d16
p1 ph2
d8
p1 ph3
p16:gp6
d16
(de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc
rdeadc RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
4u DWELL_GEN:f1

```



```

5      p13:gp3
      d16
      p13:gp4
      d16
lo to 5 times l4
100u eoscpn
lo to 2 times ns
10u ipp31
;DIAGONAL
3      d11
      d1 BLKGRAD
      50u UNBLKGRAD
      d12 pl1:f1
      p1 ph1
      5u gron1
      p11:sp1 ph4 ;180
      5u groff
      d16
      5u gron2
      p11:sp1 ph5 ;180
      5u groff
      d16
      p1 ph2
      d10
      p1 ph3
      p16:gp6
      d16
      (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc
rdeadc RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
      4u DWELL_GEN:f1
6      p13:gp3
      d16
      p13:gp4
      d16
lo to 6 times l4
100u eoscpn
lo to 3 times l3
wr #0
d11 BLKGRAD
exit
ph1=0
ph2=0
ph3=0
ph4=0
ph5=0
ph30=0
ph31=0 2

```

Programa de pulsos del experimento UF-NOESY-UF-TOCSY modulado en amplitud (ufnoesyotocsy.ucm)

```

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2+0.5"
"l1=FACTOR1*2"
1      ze

```

```

;NOESY
2      d1 BLKGRAD
      50u UNBLKGRAD
      d12 pl1:f1
      5u gron1
      p11:sp1 ph1
      5u groff
      d16
      5u gron2
      p11:sp1 ph4
      5u groff
      d16
      d8
      p1:f1 ph3
      p16:gp6
      d16
      (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc
rdeadc RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
      4u DWELL_GEN:f1
5      p13:gp3
      d16
      p13:gp4
      d16
lo to 5 times l4
100u eoscpn
lo to 2 times ns
10u ipp31
;TOCSY
3      d11
      d1 BLKGRAD
      50u UNBLKGRAD
      d12 pl1:f1
      5u gron1
      p11:sp1 ph1
      5u groff
      d16
      5u gron2
      p11:sp1 ph4
      5u groff
      d16
      d12 pl10:f1
;DIPS12
4      p6*3.556 ph23
      p6*4.556 ph25
      p6*3.222 ph23
      p6*3.167 ph25
      p6*0.333 ph23
      p6*2.722 ph25
      p6*4.167 ph23
      p6*2.944 ph25
      p6*4.111 ph23
      p6*3.556 ph25
      p6*4.556 ph23
      p6*3.222 ph25
      p6*3.167 ph23
      p6*0.333 ph25
      p6*2.722 ph23
      p6*4.167 ph25
      p6*2.944 ph23

```

```

p6*4.111 ph25
p6*3.556 ph25
p6*4.556 ph23
p6*3.222 ph25
p6*3.167 ph23
p6*0.333 ph25
p6*2.722 ph23
p6*4.167 ph25
p6*2.944 ph23
p6*4.111 ph25
p6*3.556 ph23
p6*4.556 ph25
p6*3.222 ph23
p6*3.167 ph25
p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
lo to 4 times l1
;DIPS12
    d12 pl1:f1
    p1:f1 ph3
    p16:gp6
    d16
    (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc
rdeadc RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
    4u DWELL_GEN:f1
6    p13:gp3
    d16
    p13:gp4
    d16
lo to 6 times l4          ;td=aq/dw, aq=6+(l4(2*(p16+40u)))/dw
100u eoscpn
lo to 3 times l3
wr #0 ;30m mc #0 to 2 F0(zd)
d11 BLKGRAD
exit
ph1=0
ph4=0
ph3=0
ph23=3
ph25=1
ph30=0
ph31=0 2

```

Programa de pulsos del experimento UF-ExoNOESY de tiempo constante (ufexonoesyCT.ucm)

```

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
1    ze
2    d11
    d1 BLKGRAD
    50u UNBLKGRAD
    p21:sp2 ph1
    5u gron1

```

```

p11:sp1 ph4 ;180
5u groff
d16
5u gron2
p11:sp1 ph5 ;180
5u groff d16
p31:sp3 ph2
d8
p41:sp4 ph3
p16:gp6
d16
(de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc
rdeadc RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
4u DWELL_GEN:f1
5 p13:gp3
d16
p13:gp4
d16
lo to 5 times l4
rcyc=2
30m mc #0 to 2 F0(zd & ip1 & ip2 & ip3 & ip4 & ip5 & ip31)
d11 BLKGRAD
exit
ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
ph3=0 0 2 2 1 1 3 3
ph4=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3
ph5=0 0 2 2 1 1 3 3 2 2 0 0 3 3 1 1
ph30=0
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3

```

Fichero de la forma de pulso para un pulso *chirp* de ancho de banda 60 kHz, tiempo 10 ms y ángulo de excitación de 90°

En todos las formas de pulsos programas a lo largo del desarrollo de este trabajo se han definido formas con una resolución de 1 μ s. Esto significa que un pulso de 10 ms contiene 10000 puntos que lo definen, lo que da lugar a ficheros de gran tamaño que es imposible reproducir en esta memoria. Por ello, el fichero para un pulso *chirp* de ancho de banda de 60 kHz, 10 ms de tiempo y un ángulo de excitación de 90° (*Chirp_60k_10ms_90excitacion*) se ha incluido en el el CD adjunto.

APÉNDICE B

Los programas, escritos en lenguaje Matlab, se han incluido en el CD adjunto dentro del directorio *paramadq*.

APÉNDICE C

Los programas, XprocSS y XprocUFnmr, para el procesado de los datos adquiridos con las secuencias de UF-NMR recogidas en el Apéndice A, se han incluido en el CD adjunto dentro de los directorios *XprocSS* y *XprocUFnmr*.